

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**Interação entre Fungos Micorrízicos Arbusculares e
Fusarium oxysporum f.sp *herbemontis* nos porta-
enxertos de videira SO4, R-110 e 043-43**

FABIANE PEREIRA

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**Interação entre Fungos Micorrízicos Arbusculares e
Fusarium oxysporum f.sp *herbemontis* nos porta-
enxertos de videira SO4, R-110 e 043-43**

FABIANE PEREIRA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientação: Prof^o Paulo Emílio Lovato.

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

ii

**“INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E *FUSARIUM OXYSPOURUM* F.SP
HERBEMONTIS EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA”**

POR

FABIANE PEREIRA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Hernán Terenzi
(BQA/CCB/ UFSC)**

**Prof. Dr. Fábio Kessler Dal Soglio
(Fitossanidade /Agronomia/UFRGS)**

**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
(FIT/ CCA/ UFSC)**

**Prof. Dr. Marciel J. Stadnick
(FIT/ CCA/ UFSC)**

**Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato
(ENR/ CCA/ UFSC)**

Florianópolis, maio de 2006

A minha família,
à meu pai Antonio, à minha mãe Nilva,
à meu irmão Fabrício e a meu noivo Daniel,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos pedidos concedidos de força para o fim desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Paulo E. Lovato pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Agradeço por sempre ter se mostrado interessado em me ajudar não só nos trabalhos relacionados à dissertação, mas também pela dedicação e paciência por todos os momentos de inquietação desde os tempos de bolsista, dos quais já se passaram mais de seis anos de uma agradável convivência.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina em especial aos departamentos de Engenharia Rural e Fitotecnia, nos quais passei excelentes momentos de trabalho e descontração.

Aos colegas do departamento de Engenharia Rural, pela amizade conquistada ao longo destes anos. Em especial aos amigos Murilo, Marcelo, Vanessa, Marcos (melhor dizer Blumenau), Maiara, Daniel, Chico, Luiz, bem como à nossa super secretária Bárbara e a todos os professores do departamento. A vocês meus amigos meu carinho, e total agradecimento

Ao Prof. Dr. Marciel Stadnick pelos auxílios na área fitopatológica.

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi, pela paciência e ajuda nos momentos angustiantes finais das análises bioquímicas.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetal, em especial ao Douglas pela paciência no início dos trabalhos, a Gabriela pela amizade, pelas conversas agradáveis e muito proveitosas, a Luiza, que não foi somente a responsável técnica pelo laboratório, mas sim responsável por uma grande ajuda, aos professores, funcionários e alunos do Curso de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, que superaram os limites das salas de aula, pela oportunidade de convívio, pelas lições deixadas e pelos momentos de descontração.

À minha família e ao meu noivo, pelos momentos inesquecíveis que coloriram esta etapa, e em resumo, por todos aqueles, que por ventura não foram citados, mas que contribuíram com incentivo para a realização deste trabalho.

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP *HERBEMONTIS* EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA

Autor: FABIANE PEREIRA

Orientador: PROF^o PAULO E. LOVATO

RESUMO

Um dos fatores limitantes da vitivinicultura no sul do Brasil é a fusariose, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis*. Para o controle da fusariose recomenda-se a combinação de porta-enxertos resistentes e controle biológico, no qual a utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) merece destaque. Os mecanismos que controlam o desenvolvimento do FMAs envolvem uma seqüência complexa de eventos bioquímicos e citológicos. Evidências sugerem semelhanças entre os mecanismos de defesa das plantas contra patógenos, e os mecanismos envolvidos no processo de colonização micorrízica. Com o objetivo de analisar as interações entre FMAs, *F. oxysporum* e porta-enxertos de videira (SO4, R-110 e 043-43, respectivamente suscetível, tolerante e resistente à fusariose), uma série de experimentos foi realizada. Foram realizadas técnicas de inoculação do patógeno, onde observou-se que a poda e imersão das raízes em suspensão de macro e micro conídios causou taxas mais elevadas de aparecimento de sintomas e presença do patógeno no sistema radicular. Em um outro experimento, para avaliação das interações entre FMA e *F.oxysporum*, constatou-se que a inoculação de FMAs reduziu o aparecimento de sintomas de fusariose e a mortalidade. Em um outro estudo, para avaliar os mecanismos que controlam as interações entre planta, patógeno e FMAs, foi otimizado um protocolo para extração e separação por eletroforese (SDS-PAGE) de proteínas para todos os porta-enxertos. Bandas específicas foram observadas em raízes submetidas a diferentes tratamentos de inoculação, e variam conforme o porta-enxerto. Estas diferenças nos perfis protéicos, refletem diferentes mecanismos de interação entre planta, patógeno e mutualista.

**INTERACTION AMONG ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI, *FUSARIUM*
OXYSPORUM F.SP *HERBEMONTIS* AND SO4, R-110, AND 043-43
GRAPEVINE ROOTSTOCKS**

Author: FABIANE PEREIRA

Adviser: PROF^o PAULO E. LOVATO

ABSTRACT

One of the limiting factors of viticulture in Southern Brazil is Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis*. Control of Fusarium wilt may be achieved through a combination of resistant rootstocks and biological control procedures, which include the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development involve a complex series of biochemical and cell events. These events are poorly understood, but there are evidences that some of these mechanisms are similar to the ones involved in plant defense against pathogens. In order to analyze interactions among AMF, *F. oxysporum* and three grapevine rootstocks (SO4, R-110 and 043-43, respectively susceptible, tolerant and resistant to Fusarium wilt), a series of experiments were carried out. Pathogen inoculation techniques were assessed, showing that root pruning and drenching in a conidium suspension caused the highest rates of disease symptoms and pathogen infection in roots. Another experiment, assessing plant growth when inoculated with AMF, *F.oxysporum* or a combination of both, showed that AMF inoculation reduced disease symptoms and plant mortality. In order to study mechanisms controlling the interactions between plant, pathogen and AMF, protocols for protein extraction and electrophoresis separation (SDS-PAGE) were optimized for all rootstocks. Specific bands were observed in roots from each inoculation treatment and the protein patterns varied for the different rootstocks. These differences in the protein patterns, varying according to the rootstock, reflect different mechanisms in interactions involving plant, pathogenic and mutualistic fungi.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Estabelecimento da simbiose	18
2.2. Respostas das plantas ao desenvolvimento dos FMAs	20
2.3. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e microorganismos patogênicos	21
2.4. Mecanismos regulatórios do desenvolvimento da colonização micorrízica.	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivos gerais.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Produção de inóculo de FMA.	27
4.2 Material vegetal, micropropagação e aclimatização.....	28
4.3. Avaliação de técnicas de inoculação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp herbertmontis em porta-enxertos de videira.	30
4. 4. Ação da combinação de FMA sobre a fusariose em porta-enxertos de videira.....	32
4.5. Procedimentos experimentais e analíticos para extração e quantificação de proteínas solúveis totais em raízes de videira.....	34
4.5.1. Extração de proteínas solúveis em raízes de videira	34
4.5.2. Eletroforese de proteínas solúveis	35
4.5.3. Avaliação de formas de armazenagem de material e tampões para a extração de proteínas.....	36
4.5.4. Técnica empregada para minimização de arrastes no gel	36
4.6. Avaliações de técnicas de coloração do gel de poliacrilamida	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Produção de inóculo micorrízico.....	38
5.2. Avaliação de técnicas de inoculação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>herbermontis</i> em porta-enxertos de videira.....	40
5.3. Ação da combinação de FMA sobre a fusariose em porta-enxertos de videira.....	44
5.4. Procedimentos experimentais e analíticos para extração e quantificação de proteínas solúveis totais em raízes de videira.....	51
5.4.1. Extração de proteínas solúveis em raízes de videira	51
5.4.2. Eletroforese de proteínas solúveis	52
5.4.3. Avaliação de formas de armazenagem de material e tampões para a extração de proteínas.....	53
5.4.4. Técnica empregada para minimização de arrastes no gel.....	55
5.6. Avaliações de técnicas de coloração do gel de poliacrilamida.....	55
5.7. Análise da variabilidade do proteoma de material radicular de porta- enxertos de <i>Vitis</i> sp.	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8. ANEXOS	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Amplitude e média do número de esporos viáveis (número de esporos/ 100g de solo) de fungos micorrízicos arbusculares, multiplicados em associação com manjeriço (*Ocimum basiculum*).....37

TABELA 2. Percentuais de frequência da micorrização (F%), taxa de micorrização (M%) e quantidade de arbúsculos (a%) de plantas de manjeriço (*Ocimum basiculum*), associadas a três isolados de fungos micorrízicos arbusculares.....38

TABELA 3. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSRT) de plantas do porta-enxerto SO4, não inoculadas com *F.oxysporum* (Controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), 10ml de suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* (Suspensão de conídios) e pelo método de imersão e poda radicular.....39

TABELA 4. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSRT) de plantas do porta-enxerto R-110, não inoculadas com *F.oxysporum* (Controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia) e pelo método de imersão e poda radicular.....41

TABELA 5. Percentuais de taxa de micorrização (M%) e de ocorrência de arbúsculos (a%).....43

TABELA 6. Percentuais da taxa de micorrização (M%) e quantidade de arbúsculos (A%), para os porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, na presença ou ausência de *F.oxysporum*.....43

TABELA 7. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSRT) de plantas do porta-enxerto SO4, não inoculadas com *F.oxysporum* (Controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), 10ml de suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* (Suspensão de conídios) e por imersão e poda radicular.....49

TABELA 8. Teores de proteínas solúveis totais de material radicular de *Vitis vinífera*, sob três formas de armazenagem, extraídos a partir dos tampões

descritos por LFDGV (tampão utilizado no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetal CCA- UFSC), Alfenas *et al.*, (1998) e Werth, (1985).....52

TABELA 9. Teores de proteínas solúveis totais de material radicular de *Vitis vinifera*, extraído com resina (XXXX) adicionada ao tampão (Resina), e somente com o tampão (Controle).....53

TABELA 10. Quadrados médios para os teores de proteínas encontrados no material radicular de *Vitis vinifera*, para as fontes de variação, conforme os graus de liberdade.....59

TABELA 11. Pesos moleculares das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto SO4.....65

TABELA 12. Pesos moleculares das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto R-110.....67

TABELA 13. Pesos moleculares apreentados em KDa, das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto 043-43.....68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Percentuais de presença de *F.oxysporum* nas plantas do porta-enxerto SO4, não inoculadas com *F.oxysporum* (controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), 10ml de suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* (Suspensão) e pelo método de imersão e poda radicular (I.R.).....41

FIGURA 2. Percentuais de presença de *F.oxysporum* nas plantas do porta-enxerto R-110, não inoculadas com *F.oxysporum* (controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia) e pelo método de imersão e poda radicular (I.R.).....43

FIGURA 3. Massa fresca de parte aérea dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 inoculados com fungos micorrízicos arbusculares e *F.oxysporum* (FMA + FUS), fungos micorrízicos arbusculares (FMA), *F.oxysporum* (FUS) e não inoculados (Controle).....46

FIGURA 4. Massa fresca radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 inoculados com fungos *F.oxysporum* na presença de fungos micorrízicos arbusculares, (FMA + FUS), fungos micorrízicos arbusculares (FMA), *F.oxysporum* (FUS) e não inoculados (Controle).....46

FIGURA 5. Percentuais de presença de *F.oxysporum* nas plantas dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, inoculadas com *F.oxysporum* na presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA +FUS) e na ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FUS).....46

FIGURA 6. Bandas protéicas observadas em raízes dos porta-enxertos SO4 (1a, 2a, 3a e 4a), R-110 (1b, 2b, 3b e 4b) e 043-43 (1c, 2c, 3c e 4c), submetidas aos tratamentos de presença de FMAs e *F.oxysporum* (1a, 1b e 1c), presença de FMAs (2a, 2b e 2c), presença de *F.oxysporum* (3a, 3b e 3c) e tratamento controle (4a, 4b e 4c). O padrão de proteínas esta representado pela letra P, e os valores numéricos representam os pesos moleculares em KDa.....58

FIGURA 7. Teores de proteínas solúveis totais extraídos de material radicular de *Vitis vinífera* expressos em microgramas de proteína presentes por grama de material radicular (mg proteína/ g raiz) dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, submetidos a tratamentos de inoculação de *F.oxysporum* na presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA + FUS), inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), inoculação de *F.oxysporum* (FUS) e tratamento controle.....63

FIGURA 8. Esquema do gel de poliacrilamida apresentado na figura 8. Bandas protéicas observadas a partir de material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 submetidas a tratamentos inoculação micorrízica e de *F.oxysporum* (FMA + FUS), inoculação de fungos micorrízicos (FMA), inoculação de *F.oxysporum* (FUS) e tratamento controle. O padrão de proteínas esta representado pela letra P.....64

1. INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira, tem avançado tanto nos produtos elaborados como na produção de uvas para consumo *in natura*. Em 2004 foram produzidas 1.281.802 toneladas de uvas em 70.531 hectares, representando aumento de produtividade de 21,51% em relação ao ano anterior (EMBRAPA, 2005). Para os Estados da Região Sul, a atividade vitivinícola é de grande importância sócio econômica. Em Santa Catarina, principalmente na Região do Vale do Rio do Peixe, a vitivinicultura é uma atividade de alta relevância sócio-econômica, ao gerar uma expressiva quantidade de empregos e renda a muitos fruticultores catarinenses (ICEPA-SC, 2000; EPAGRI, 2000; SOUZA, 1996; KUHN et al., 1984).

A produção anual de uvas no Estado de Santa Catarina foi de 44.612 toneladas (EMBRAPA, 2005). Segundo o Cadastro Vitícola do Vale do Rio do Peixe (MELLO, 2000), a viticultura desta região ocupa uma área de 1.706,91 ha, apresentando grande similaridade com a da Região da Serra Gaúcha, quanto à estrutura fundiária, topografia e tipo de exploração vitícola. Assim como na Serra Gaúcha, o cultivo de videira no Estado de Santa Catarina é baseado no uso de mão-de-obra familiar e voltado à produção de uvas destinadas à elaboração de vinhos de consumo corrente e suco de uva, sendo uma parte menor da produção destinada ao consumo *in natura* (EMBRAPA, 2003). Atualmente, em decorrência de um cenário econômico favorável devido à volta de investimentos e pesquisas no setor, há perspectivas de que Santa Catarina atenderá em pouco tempo a um mercado em expansão, inserindo o Estado e o próprio País no circuito internacional de vinhos nobres de alto valor agregado, devido ao desenvolvimento de técnicas de produção para a chamada região super nova, ou de altitude, que compreende as cidades do planalto (BRDE, 2005).

Mesmo com a atividade vitivinícola apresentando tendências positivas e projeções de lucratividade, em algumas regiões produtoras dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina observa-se, desde a década de 90, índices significativos de abandono da atividade. Isso causou, considerável queda de produtividade e forte redução na área plantada (ROSIER & LOSSO, 1997). O

abandono da atividade. Isso causou, considerável queda de produtividade e forte redução na área plantada (ROSIER & LOSSO, 1997). O abandono da atividade, entre outros fatores, é decorrente da alta utilização de agrotóxicos devido à alta susceptibilidade da cultura a doenças fúngicas (KREUZ et al., 2005, MOREIRA, 2000; GALLOTTI & GRIGOLETI, 1990). A alta utilização de agrotóxicos, além de causar sérios prejuízos à saúde humana, é também responsável pelo aumento dos custos de produção da atividade, sem, no entanto, aumentar a produtividade de forma a justificar o capital investido, piorando inclusive a qualidade da uva, que vêm a ser colhida antes de completar a maturação (SCHUCK et al., 2001).

Um dos problemas que gerou queda de produtividade, a partir da década de 90, foi a ocorrência da anomalia conhecida como declínio e morte das plantas ou fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis*. Este patógeno causa redução drástica da produtividade da videira, por atacar o sistema radicular, especialmente nos híbridos *Vitis riparia* x *Vitis berlandieri* (SO4), um dos porta-enxertos mais utilizados nos vinhedos de Santa Catarina até o final da década de 90 (BORGHEZAN et al., 2003).

A fusariose é uma doença vascular que provoca interrupção na translocação da seiva bruta, vindo a reduzir o crescimento de brotos, e provocando escurecimento interno da madeira, murchamento de folhas e de cachos. Os cachos murcham ainda verdes ficando aderidos aos ramos. As plantas infectadas podem morrer subitamente, normalmente em reboleiras (EMBRAPA, 2003). As áreas de vinhedos contaminadas com este patógeno de solo tornam-se inviáveis para o cultivo desta frutífera (BORGHEZAN et al., 2003; SÔNEGO, 1998).

Como o controle químico é de alto custo, pela necessidade de incorporação de agroquímicos nos solos afetados, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de manejo que integrem resistência varietal e controle biológico, os mais justificáveis do ponto de vista ambiental e econômico.

Os patógenos que afetam o sistema radicular, principalmente os que causam doenças vasculares, são de difícil manejo, pois normalmente têm no solo seu *habitat* natural. As medidas de controle químico se restringem à fase de viveiro, sendo os tratamentos testados de baixa eficiência, não se

mostrando viáveis, por não serem capazes de proporcionar proteção às plantas contra o ataque de *Fusarium oxysporum*. O método de controle que se mostrou mais eficiente foi o emprego de variedades resistentes (BORGHEZAN et al., 2003; SCHUCK et al., 2001; SOUZA, 1996; ANDRADE et al., 1993).

O uso de práticas que aumentem a capacidade de resistência das plantas ao ataque de patógenos radiculares devem ser desenvolvidas. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) vem mostrando-se um método promissor no controle biológico da fusariose. O uso da cultura *in vitro* têm também apresentado grande progresso com relação aos problemas de fitossanidade, fisiologia e genética (MOREIRA, 2000).

As associações entre raízes e determinados fungos do solo, denominadas micorrizas, ocorrem na maioria das espécies vegetais superiores. As micorrizas representam um fenômeno de ocorrência generalizada, resultante da união orgânica entre as raízes e o micélio de fungos, criando um órgão morfológico com dependências fisiológicas íntimas e recíprocas (EMBRAPA, 2004).

No caso de plantas micropropagadas, o estabelecimento da associação micorrízica é mais viável em fases *ex vitro*, durante a aclimatização (SAGGIN JÚNIOR & LOVATO, 1999). A fase de aclimatização de mudas micropropagadas é crítica e delicada, por ser uma transição entre as condições controladas do sistema *in vitro* e o ambiente natural, e principalmente pelo fato das plantas passarem de uma condição heterotrófica para outra autotrófica, ocorrendo ativação funcional dos estômatos e das raízes. As plantas podem ser associadas a FMAs após a aclimatização, mas a introdução precoce da simbiose traz vantagens como uma aceleração do crescimento das raízes e da parte aérea (SAGGIN JÚNIOR & LOVATO, 1999). Os benefícios da inoculação incluem encurtamento das fases *in vitro* e de aclimatização (VESTBERG, 1992; AZCÓN-AGUIAR et al., 1992), maior homogeneidade de plantas (BLAL & GIANINAZZI-PEARSON, 1989) e diminuição na severidade de ataque de fungos fitopatogênicos em raízes de plantas micorrizadas (PAULITZ & LINDERMAN, 1991; GIANINAZZI et al., 1982; SCHENK & KELLAM, 1978). Assim, técnicas de inoculação de FMAs para a cultura da videira mostram-se de grande importância, por proporcionarem um aumento da resistência ao ataque de patógenos de solo.

Assim, os experimentos realizados objetivaram viabilizar o uso de biotecnologias, dentre as quais a micropropagação e o uso de fungos micorrízicos arbusculares, de modo a oferecer perspectivas de melhoras na produção de mudas de videira, principalmente no que diz respeito ao controle da fusariose. Procura-se para isto técnicas que apoiam um modelo de agricultura com redução de insumos químicos. Modelo, mais sustentável, passa a ser não somente necessário, mas fundamental para um total crescimento da atividade vitivinícola, bem como para a permanência dos agricultores no setor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo micorriza foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885 (SCHENCK & KELLAM, 1978). Este termo descreve a associação simbiótica mutualista estabelecida entre as raízes da maioria das plantas vasculares e certos fungos de solo. Esta associação exerce enorme efeito sobre o desenvolvimento vegetal por proporcionar aumentos de crescimento e de produtividade em plantas (SIQUEIRA et al., 2002).

Os FMAs pertencem à divisão *Glomeromycota* (SCHÜSSLER et al., 2001), sendo agrupados em sete gêneros *Acaullospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* e *Scutellospora*, com aproximadamente 160 espécies descritas (INVAM, 2005). Estes fungos têm distribuição generalizada sendo a simbiose mutualística mais comum da natureza (SIQUEIRA et al., 2002). Esta associação resulta no crescimento de ambas as partes, com funções fisiológicas estreitas e dependências fisiológicas íntimas e recíprocas (GALLOTTI, 1990).

A associação geralmente supõe uma relação benéfica para os organismos envolvidos. Ao colonizar a planta, o fungo proporciona a esta nutrientes minerais e água, extraídos do solo por meio de uma rede externa de hifas. Por outro lado, a planta fornece ao fungo substratos energéticos e carboidratos elaborados a partir da fotossíntese. As micorrizas são de importância, visto que são distribuídas na maioria dos cultivos tropicais e subtropicais de valor econômico (SIEVERDING, 1991).

2.1. Estabelecimento da simbiose

O estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular depende de uma série de eventos para que ocorra a total e íntima interação entre os simbiontes. O processo de infecção ocorre a partir do contato de hifas infectivas, provenientes de esporos, hifas de solo ou hifas intrarradiculares presentes nas raízes de plantas micorrizadas. Após o contato entre planta e fungo, se dá início a uma série de eventos morfológicos e bioquímicos específicos,

regulados pelos simbioses e afetados por fatores abióticos que vêm a determinar o desenvolvimento e estabelecimento da simbiose (ROMERO, 1999). O processo de colonização se estende pela epiderme e parênquima cortical, nunca penetrando a endoderme, bem como os tecidos vasculares e meristemáticos (HARLEY & SMITH, 1983), estabelecendo assim, uma diferença marcante entre as infecções radiculares provocadas por fungos patogênicos.

O processo de formação da simbiose começa com a germinação dos esporos de resistência no solo, que só ocorre sob condições favoráveis de temperatura e umidade. Seguindo-se a emissão do tubo germinativo, o micélio fúngico cresce até encontrar uma raiz hospedeira, para formar uma estrutura similar ao apressório e penetrar nas células epidérmicas através dos pelos radiculares. Após a penetração, começa a colonização dos tecidos parênquimáticos da raiz. Na parte interna destes tecidos se formam os arbúsculos, e a troca de nutrientes entre os simbioses ocorre nestas estruturas fúngicas intrarradiculares especializadas. Tais estruturas são formadas pela intensa ramificação dicotômica das hifas e invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (SIQUEIRA et al., 2002). Além dos arbúsculos, o fungo mantém um micélio externo que absorve nutrientes do solo e posteriormente os libera para as raízes. A parede celular dos arbúsculos e as membranas periarbusculares que os envolvem são separadas por uma interface característica, importante para o controle da simbiose. Nesta membrana estão presentes vários tipos de moléculas, incluindo xiloglucanas, arabinogalactanas, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, enzimas hidrolíticas e moléculas sinais (SIQUEIRA et al., 2002). Outra estrutura característica da maioria dos fungos micorrízicos arbusculares são as vesículas, geralmente formadas nas extremidades das hifas e podendo ser produzidas ao longo de todo o parênquima cortical colonizado. As vesículas são consideradas órgãos de reserva, principalmente de lipídios (COOPER & LÖSEL, 1978).

Quando a infecção interna está bem estabelecida, as hifas do fungo podem crescer externamente desde a raiz da planta até o solo e explorar um volume de solo inacessível as raízes (SIEVERDING, 1991). Os FMAs produzem normalmente esporos a partir do micélio externo que em alguns casos, são formados no interior da raiz. Os esporos de resistência podem

permanecer inalterados no solo por um longo período. Após a germinação do esporo, as hifas do fungo permanecem vivas no solo por 2 a 4 semanas até encontrarem uma raiz hospedeira (BOLAN & ABBOTT, 1983)

2.2. Respostas das plantas ao desenvolvimento dos FMAs

A resposta rápida e eficaz das plantas, a partir do reconhecimento de um agente invasor, é pré-requisito para a iniciação de uma resposta eficaz de defesa. Esta resposta se dá através da recombinação de moléculas de sinais específicas, também conhecidas como elicitores. Os elicitores são secretados pelos microorganismos (elicitores exógenos) ou gerados por consequência da clivagem física e/ou química da parede vegetal (elicitores endógenos). Após o reconhecimento de um elicitor, um número de mudanças bioquímicas, contribui para as respostas das plantas (LAMBAIS, 1999). Estes processos incluem mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, a ativação das quinases, fosfatases, fosfolipases, e a produção de moléculas de sinal. O resultado destes processos é a ativação dos genes relacionados com a defesa vegetal (SOMSSICH & HAHLBROCK, 1998).

Alguns eventos similares aos encontrados em interações planta-patógeno foram encontrados também na interação de plantas com FMAs. Estes eventos incluem a percepção de sinais na transdução, bem como a ativação de genes da defesa. Salzer e Boller (2000), sugerem que os fungos ectomicorrízicos e os micorrízicos arbusculares secretam elicitores de ação similar a quitina, podendo induzir uma resposta de defesa (GARRIDO & OCAMPO, 2002). Em trabalho realizado por Lambais (1999), um elicitor derivado de extrato de micélio extrarradicular extraído de *Glomus intraradices* induziu a síntese de fitoalexinas nos cotilédones de soja. No entanto, a hipersensibilidade, resposta geralmente observada quando a planta é confrontada com um patógeno, pode ser observada em associações compatíveis com FMAs. Uma resposta de hipersensibilidade pôde ser detectada nos locais em que as hifas de *G. intraradices* tentaram penetrar uma raiz de *Medicago truncatula* (SALZER et al., 1999).

Em plantas micorrizadas de tabaco houve aumentos transientes da atividade de catalase e de peroxidase, e tais aumentos coincidiram com a penetração das hifas de FMAs nas raízes (BLILOU et al., 2000). Os aumentos na atividade de catalase e de peroxidase observada em raízes micorrizadas de tabaco, coincidiram também com o acúmulo de ácido salicílico nas mesmas (BLILOU et al., 2000). O ácido salicílico é uma molécula de sinal envolvida na transdução, ativada em reações de planta-patógeno (MALAMY et al., 1990.; MÉTRAUX et al., 1990). Um acúmulo de ácido salicílico durante os estágios adiantados da colonização foi observado na interação entre arroz e *G. mosseae*. Neste caso, o acúmulo de ácido salicílico foi correlacionado a um aumento na expressão dos genes que codificam a proteína de transferência de lipídeos, fornecendo evidências de que a indução destas proteínas é parte do processo de defesa da planta (BLILOU et al., 2000).

As respostas de defesa das plantas micorrizadas nos estágios adiantados da colonização têm uma ativação fraca e transiente, mas, no momento da formação do arbúsculo, a ativação de defesa parece se tornar mais forte. O caráter fraco da resposta de defesa da planta poderia ser uma consequência da baixa capacidade que o fungo tem de provocar ou induzir um mecanismo de supressão a uma resposta já ativada de defesa, permitindo assim o crescimento do micélio fúngico dentro do tecido vegetal.

2.3. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e microorganismos patogênicos

Nos últimos anos, as sistemas agrícolas considerados sustentáveis são caracterizados pela reduzida inserção de insumos, bem como pelo aumento considerável de práticas conservacionistas, onde incluem-se a utilização de microrganismos no manejo integrado de pragas e doenças, controle biológico e conservação do solo. Nas últimas décadas têm se multiplicado as evidências do efeito benéfico das associações micorrízicas com diversas plantas superiores de importância econômica. Em algumas espécies vegetais, é tão acentuada a dependência à presença desses fungos que na ausência total da

simbiose elas não respondem satisfatoriamente à adubação fosfatada (TRINDADE et al., 2000).

As espécies frutíferas destacam-se entre o grupo de plantas em que as micorrizas mereceram maior atenção no que se refere aos efeitos benéficos da simbiose. Embora o papel preponderante das micorrizas seja reconhecido na melhoria da nutrição mineral das plantas, este não é o único benefício da simbiose. Outros efeitos benéficos também são proporcionados pela associação e, dentre esses, destacam-se mudanças hormonais favoráveis à planta hospedeira e melhor tolerância e/ou resistência a patógenos radiculares (TRINDADE, 2000).

A interação entre fungos micorrízicos e fungos fitopatogênicos do solo tem mostrado que plantas micorrizadas, em geral, apresentam menores danos que as não micorrizadas, como resultado da diminuição na incidência da doença ou pela inibição do desenvolvimento do patógeno (SILVEIRA, 1992). Estudos demonstram que os mecanismos de ação envolvidos no aumento de tolerância da planta micorizada a patógenos estão relacionados a alterações na qualidade e quantidade de nutrientes na rizosfera, à produção de aminoácidos e açúcares redutores, às alterações na fisiologia das raízes e aumento de espessura da parede de células corticais, à competição física por espaço na raiz, ao estímulo da população rizosférica antagônica, à maior lignificação das raízes e à maior absorção de nutrientes pela micorriza, principalmente fósforo, o que lhe confere maior vigor e crescimento ao simbiote vegetal. Assim, associações simbióticas do tipo das micorrizas podem diminuir a suscetibilidade das plantas contra patógenos veiculados pelo solo (CAVALCANTI et al., 2002).

Em trabalho realizado por Cordier et al. (1998), foi demonstrado que *Glomus mosseae* induziu resistência sistêmica em tecido de tomate contra *Phytophthora parasitica*. Cavalcanti et al. (2002), referenciando o trabalho de Cordier et al. (1998), afirmam que a resistência local conferida por FMAs por *G. mosseae* pode ocorrer pela incapacidade das hifas do patógeno invadirem as células do hospedeiro contendo árbusculos, e que a resistência sistêmica, em partes da raiz não colonizadas por FMAs, caracteriza-se pelo engrossamento da parede celular e pela formação de material rico em calose. O efeito protetor do fungo micorrízico contra fitopatógenos radiculares, ocorre

quando ambos os microorganismos estão presentes na rizosfera, sendo que a pré-colonização da raiz pelo FMA se mostra mais eficiente (SILVEIRA, 1992, BOLAN, 1991).

2.4. Mecanismos regulatórios do desenvolvimento da colonização micorrízica.

O estabelecimento da associação e colonização micorrízica resulta de uma seqüência de eventos e interações coordenados pelos simbiontes, culminando numa relação de integração morfológica, bioquímica e funcional. No entanto, os mecanismos que regulam o desenvolvimento e funcionamento deste processo, ainda não são totalmente conhecidos. Nos últimos anos, os estudos relacionados à simbiose micorrízica têm se concentrado em nutrição mineral, destacando-se a relação entre FMAs e fosfatos.

Embora sejam limitados os estudos relacionados aos mecanismos envolvidos na regulação da colonização intrarradicular, bem como da eficiência simbiótica, Bolan (1991) mostrou evidências que esta regulação depende do grau nutricional da parte aérea. Lambais (1999), sugere que a regulação e o desenvolvimento da colonização micorrízica dependem de genes com expressão diferencial nos FMAs, que poderiam ter papel importante no controle da simbiose.

Com base num possível efeito das proteínas de defesa vegetal no controle do crescimento intrarradicular de FMAs, estudos sobre a regulação destas proteínas têm sido realizados nos últimos anos, com ênfase na via biossintética de fitoalexinas isoflavonóides, proteínas envolvidas no reforço da parede celular vegetal, e proteínas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos fungos (SOUZA, 2002). A codificação de diferentes isoformas de quitinases por genes apresenta expressão diferencial durante o desenvolvimento de FMAs, mas seu papel na simbiose ainda não é conhecido. As atividades de quitinases são, no entanto, normalmente suprimidas nos estágios iniciais do desenvolvimento de FMAs e induzidas posteriormente (LAMBAIS & MEHDY, 1998). As quitinases possivelmente estão envolvidas na degradação da parede celular fúngica, inibindo a colonização intrarradicular.

Contudo, a expressão constitutiva de uma isoforma básica de quitinase em plantas de tabaco não inibiu o desenvolvimento de *Glomus intraradices* (DAVID *et al.*, 1998). Segundo Volpin *et al.* (1995), durante os estágios iniciais do desenvolvimento de FMAs em alfafa colonizada por *Glomus intraradices*, foram observados aumentos nas atividades enzimáticas de fenilalanina amônia liase, bem como nos níveis de seus respectivos mRNAs nas regiões colonizadas da raiz, seguidos por posterior supressão.

A utilização dos modelos de sinalização que ocorrem nas simbioses de *Rhizobium* com leguminosas e em interações entre plantas e patógenos, são de grande importância, para a compreensão dos processos atuantes em FMAs, visto que as simbiose têm processos semelhantes (WYSS *et al.*,1990). Tais processos estão relacionados como o que altos níveis de nitrato inibem o estabelecimento da interação entre leguminosas e rizóbios, assim como altos teores de P inibem a micorrização. Wyss *et al.* (1990) realizaram um trabalho com o objetivo de procurar um fator comum para o mecanismo de controle da simbiose para nodulação e micorrização. Para isso, foram utilizados dois tipos mutantes de soja, o primeiro de plantas não nodulantes, e o segundo de plantas super-nodulantes, insensíveis a altos níveis de nitrato. Os autores tinham como hipótese que a inibição da nodulação em altos níveis de nitrato seria mediada pelo mesmo fator que inibiria a micorrização, e procuraram verificar se os mutantes super-nodulantes também seriam capazes de serem colonizados por FMAs em altos níveis de P. Os resultados mostraram que nas plantas super-nodulantes, a micorrização foi inibida sob condições de altos teores de P, indicando que o fator que controla a supressão da micorrização em altos níveis de P não é o mesmo fator que controla a nodulação em altos níveis de nitrato. Dando continuidade a este trabalho, Wyss *et al.* (1990) detectaram, em raízes micorrizadas, proteínas semelhantes às nodulinas, isto é específicas de nódulos. Em raízes de *Vicia faba*, colonizadas por *Glomus fasciculatum*, foi identificada uma das mais importantes nodulinas, a leghemoglobina Vflb 29 (FRUHLING *et al.*,1997). O papel desta proteína em interações micorrízicas ainda não está esclarecido, mas, uma das possibilidades seria o envolvimento desta no fornecimento de oxigênio ao FMA, da mesma forma que em interações *Rhizobium*/ leguminosas.

Por meio da técnica da eletroforese bidimensional e microsequenciamento de proteínas, foram detectadas em torno de 16 proteínas da membrana plasmática, que são diferencialmente expressas em raízes micorrizadas e não micorrizadas (HAHN & MENDGEN, 2001). Os sinais moleculares, assim como ocorre em várias interações planta-micoorganismo, poderiam ser reconhecidos na membrana plasmática e transmitidos através de mensageiros secundários até sítios de transcrição gênica, regulando o processo de síntese. No caso dos FMAs, esta regulação de genes vegetais e fúngicos específicos, ainda não identificados, seria responsável pelo controle do desenvolvimento e funcionamento da simbiose. O estudo dos processos de sinalização e transdução de sinais em FMAs são bastante complexos, pois as diferentes etapas dos processos de infecção, colonização e troca de nutrientes são provavelmente regulados por uma permanente troca de sinais entre os simbioses (SOUZA, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar a interação entre *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis* e Fungos Micorrízicos Arbusculares em porta-enxertos de videira resistentes, tolerantes e suscetíveis à presença do patógeno

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar efeitos de diferentes formas de inoculação na severidade de infecção de *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis* em porta-enxertos de videira resistentes, tolerantes e suscetíveis ao patógeno;
2. Avaliar interações entre Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis* no crescimento de porta-enxertos de videira resistentes, tolerantes e suscetíveis à presença do patógeno.
3. Extrair, quantificar e caracterizar proteínas solúveis em raízes de videira, com vistas a estudos da interação entre Fungos Micorrízicos Arbusculares e *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis* em porta-enxertos de videira resistentes, tolerantes e suscetíveis à presença do patógeno

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de inóculo de FMA.

Os inóculos utilizados nos experimentos são isolados de FMAs, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp, fornecidos pelo Laboratório de Ecologia do Solo - Departamento de Engenharia Rural – CCA – UFSC. Para a multiplicação do inóculo foi utilizado como hospedeiro manjerição (*Ocimum basiculum*). O hospedeiro foi cultivado em vasos de 1000ml, previamente desinfestados com hipoclorito de sódio (5%) e água destilada. O substrato foi preparado à base de Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico e vermiculita (2:3:3,v:v:v), já testado em trabalhos anteriores (CASSOL, 1996). O substrato foi desinfestado durante 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770 KK, 2450Mhz, 1420 W), a fim de eliminar a atividade microbiológica do solo, sem alterar de maneira significativa às propriedades físicas e químicas do substrato (TREVORS, 1996). As sementes do hospedeiro foram desinfestadas durante 15 minutos em solução de 400ml de água destilada e 100ml de hipoclorito de sódio, sendo a seguir colocadas em vasos com 950ml de substrato e 50ml de inóculo micorrízico.

A multiplicação do inóculo micorrízico foi conduzida em câmara de crescimento com temperatura de 20-25°C, 16h de luz.dia⁻¹, radiação fotossinteticamente ativa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 70-80% de umidade relativa do ar. Após um período de 30 dias da semeadura, todos os vasos receberam aplicações quinzenais de 25ml de solução nutritiva Long-Ashton (BRUNDRETT & PETERSON, 1994) modificada (10% de fósforo da composição original).

A avaliação da multiplicação do inóculo micorrízico foi realizada ao final de três meses de cultivo, a partir da contagem do número de esporos de fungos micorrízicos, utilizando processo de peneiragem e centrifugação descrito por Brundrett & Peterson, (1994). Amostras de 100g de solo próximo às raízes foram coletadas e suspensas dissolvidas em 1000ml de água destilada. Após 24h em decantação, as amostras foram transferidas para um

conjunto de peneiras de 0.2 - 0.08mm e levadas à centrífuga (3 minutos, 5000 rpm). O sobrenadante foi descartado, o resíduo contendo os esporos foi misturado a uma solução de 50% de sacarose e levado novamente à centrífuga (3 minutos, 5000rpm). O sobrenadante foi colocado em placas de Petri quadriculadas (0,5 cm²), para contagem do número de esporos. A avaliação da taxa e frequência de colonização micorrízica foi realizada através do método de coloração com azul de tripano (GIANINAZZI & GIANINAZZI - PEARSON , 1992) e avaliação em lâminas (TROUVELOT et al., 1985). A produção de inóculo micorrízico foi realizada em blocos completamente casualizados com 3 repetições (vasos de produção) para cada isolado micorrízico. Os resultados da produção de inóculo foram submetidos à análise de variância, e quando houve efeitos significativos dos tratamentos as médias foram separadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ao nível de 5% de probabilidade.

A mistura do solo e do sistema radicular do hospedeiro utilizado na multiplicação de cada isolado de FMA (*Glomus etunicatum*, *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp) constituiu o inoculante micorrízico.

4.2 Material vegetal, micropropagação e aclimatização.

Os porta-enxertos utilizados 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), R-110 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) e SO4 (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*) são variedades que apresentam respectivamente resistência, tolerância e susceptibilidade à fusariose (BORGHEZAN et al, 2003; GALLOTTI, 1991). Os porta-enxertos 043-43 e R-110 foram fornecidos pelo Laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia – CCA – UFSC, que vem desenvolvendo técnicas de produção dos mesmos a partir de culturas de meristemas (LIMA da SILVA & DOAZAN, 1995). O porta-enxerto SO4 foi fornecido pelo Departamento de Horticultura e Silvicultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As plantas matrizes dos porta-enxertos 043-43 e R-110 são mantidas e controladas em casa de vegetação no CCA-UFSC e foram provenientes do programa de melhoramento de videira da

Universidade de Davis – UC – Califórnia (EUA), Istituto Agrário San Michele de all'Adige (Província Autônoma de Trento – Itália) e Centre de Recherches Agronomiques de Bordeaux (INRA – França).

O material vegetal foi multiplicado *in vitro*, utilizando a metodologia de gemas axilares descrita por Galzzy, (1985) que permite multiplicar clones de videira por tempo indeterminado, através de repicagens sucessivas. As plantas foram micropropagadas *in vitro* em frascos de 250ml contendo 50ml de meio de cultura DSD1 (LIMA DA SILVA & DOAZAN, 1995) com sacarose ($20,0\text{g L}^{-1}$) e ágar-ágar ($5,5\text{g L}^{-1}$), isento de reguladores de crescimento e com pH 6,4. Os frascos foram mantidos durante 60 dias (ou até novas repicagens) em sala de cultura do laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia, sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade incidente de $40\text{-}45\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ao nível do frasco. A umidade relativa do ambiente de cultura variou entre 60-70%.

Os explantes das variedades 043-43, R-110 e SO4, após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados dos frascos com meio DSD1 para a realização de podas, para padronizar o número de 3 a 4 folhas basais e de 1,5cm de raiz por explante. As raízes foram colocadas em água destilada para a completa retirada do meio de cultura, cortadas e transplantadas para bandejas de poliestireno expandido, com células de 40ml contendo o substrato correspondente ao porta-enxerto e ao tratamento a ser avaliado. As formulações dos substratos utilizados, foram previamente testadas em trabalho anterior (PEREIRA & LOVATO, 2002), sendo, formulados a partir da mistura de Nitossolo Vermelho Distroférico, composto termofílico, vermiculita e areia. Após o transplante para as bandejas, estas foram mantidas em caixas plásticas cobertas com vidros e transferidas para câmara de crescimento do Departamento de Engenharia Rural – CCA – UFSC com temperatura de $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$, 16h de luz.dia⁻¹, radiação fotossinteticamente ativa de $100\ \mu\text{mol.m}^{-2}$ e 70-80% de umidade relativa do ar. A partir do 15º dia foi realizada a abertura progressiva do vidro de cobertura, a fim de aclimatizar as plantas à atmosfera ambiente.

4.3. Avaliação de técnicas de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp *herbemontis* em porta-enxertos de videira.

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *herbemontis*, foram fornecidos pelo Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os isolados foram multiplicados e conservados em meio agarizado inclinado.

A avaliação de diferentes formas de inoculação de *Fusarium oxysporum* decorre da necessidade de se constatar em qual método de inoculação o aparecimento de sintomas de murcha vascular é mais evidente. Este experimento buscou determinar qual método de inoculação promove uma resposta rápida, de inibição do desenvolvimento vegetativo e radicular nos porta-enxertos avaliados. Para isto, se implantou um experimento com três tratamentos (e/ou métodos de inoculação) para os porta-enxertos SO4 e R-110, respectivamente susceptíveis e tolerantes ao patógeno. Neste experimento não se utilizou o porta-enxerto 043-43, por este ser resistente a fusariose. Para os três métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemontis* avaliados, o contato do patógeno com a planta se deu 30 dias após o término do período de aclimatização, com as plantas já transplantadas para sacos plásticos de 1000ml. No primeiro método, o substrato próximo as raízes dos porta-enxertos, foi acrescido de 10g de grãos de aveia infectados com *Fusarium oxysporum* (TOMAZI et al., 1998). No segundo método, o substrato foi inoculado com 10ml de uma suspensão de *Fusarium oxysporum*, no terceiro método, de imersão radicular, as raízes foram cortadas 4-5cm abaixo do colo e a seguir lavadas em água corrente. As plântulas ficaram imersas em suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* durante 1h e foram posteriormente transferidas para sacos de 1000ml contendo substrato estéril. As suspensões utilizadas no segundo e terceiro métodos de inoculação foram produzidas a partir de placas contendo isolados de *F.oxysporum*. As placas foram raspadas superficialmente com o auxílio de uma espátula de vidro e 1ml de água destilada estéril. A suspensão obtida foi filtrada por duas camadas de gaze e uma amostra foi retirada para contagem de macro e microconídios por meio do hemacitômetro de Neubauer, para ajuste da concentração do inóculo. As concentrações de macro e microconídios

utilizadas nos tratamentos descritos foram de $1,250 \times 10^6$ e $1,425 \times 10^7$, respectivamente. O tratamento controle foi composto por 10g de grãos de aveia esterilizados, 10ml de água destilada estéril e imersão durante 1h em água destilada estéril.

Para ambos os tratamentos, os substratos utilizados foram formulados a base de Nitossolo vermelho distroférico, composto termofílico, e areia na proporção de (1:1:1, v:v:v.) para o porte-enxerto R-110; Nitossolo vermelho distroférico, composto termofílico e vermiculita na proporção de (2:3:3, v:v:v), para o porta-enxerto SO4; ambos já testados em trabalho anterior (PEREIRA & LOVATO, 2002). Os substratos foram desinfestados por 10 minutos em forno de microondas (National NE 7770 KK, 2450Mhz, 1420 W), a fim de eliminar a atividade microbiológica do solo (TREVORS, 1996). O experimento foi montado em câmara de crescimento com temperatura de 20-25°C, 16h de luz.dia⁻¹, radiação fotossinteticamente ativa de 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, 70-80% de umidade relativa do ar. Foram realizadas aplicações quinzenais de solução nutritiva Long-Ashton (BRUNDRETT et al., 1994) modificada (10% de fósforo da composição original), na quantidade de 10 ml de solução por planta. As plantas ficaram em observação durante 120 dias, até o surgimento dos sintomas típicos da fusariose. Para verificação do percentual de presença e/ou ausência do patógeno, foram coletadas raízes de plântulas de todos os tratamentos. As raízes coletadas foram lavadas e desinfetadas durante cinco minutos em álcool 50%, enxaguadas e colocadas em hipoclorito de sódio 1% permanecendo neste por um período de cinco minutos. Após o enxague em água destilada as raízes foram colocadas em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA), permanecendo em estufa de crescimento durante um período de 48 horas, para posterior avaliação da presença de *F. oxysporum*. O desenvolvimento vegetativo da plantas, foi avaliado por meio das massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular.

O experimento de avaliação de técnicas de inoculação de *Fusarium oxysporum* em porta-enxertos de videira foi realizado em blocos completamente casualizados com 12 repetições por tratamento e/ou método de inoculação. As massas frescas e secas de parte aérea e radicular foram submetidas à análise de variância, e quando houve efeitos significativos dos

tratamentos as médias foram separadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ao nível de 5% de probabilidade.

4. 4. Ação da combinação de FMA sobre a fusariose em porta-enxertos de videira.

Para a avaliação do potencial de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em proteger porta-enxertos de videira ao ataque do *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*, um experimento foi composto por tratamentos de inoculação micorrízica no qual as plantas das três variedades receberam uma mistura de inóculos micorrízicos constituída de isolados de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum* # 69, *Glomus clarum* # 31 e *Acaulospora* sp. # 45), e o tratamento controle foi composto pelo inoculante micorrízico esterilizado.

Na aclimatização (LIMA DA SILVA et al., 1997), os explantes foram transferidos para bandejas de poliestireno expandido com células de 40ml, contendo substrato misturado ao inoculante micorrízico. O substrato utilizado para a aclimatização dos porta-enxertos foi acrescido de 5 gramas da mistura de inoculante micorrízico. O substrato utilizado foi à base de Nitossolo Vermelho Distroférrico, composto termofílico e areia, na proporção de (1:1:1, v:v:v.) para o porte-enxerto 043-43 e R110; Nitossolo Vermelho Distroférrico, composto termofílico e vermiculita na proporção de (2:3:3, v:v:v), para o porta-enxerto SO4, ambos já testados em trabalho anterior (PEREIRA & LOVATO, , 2002). Os substratos foram acondicionados em sacos de algodão e autoclavados duas vezes consecutivas durante 20 minutos, a fim de eliminar a atividade microbiológica do solo e imediatamente após o transplante, as plantas receberam um filtrado contendo a biota não micorrízica do solo. Para isso, 100g de inoculante micorrízico foram colocados em um litro de água destilada. Após agitação intensa, a suspensão obtida foi passada em papel filtro com abertura de 50µm, adicionando-se 1 ml dessa suspensão a cada uma das plantas dos tratamentos denominados não inoculados (LOCATELI & LOVATO, 2002). Os explantes foram aclimatizados durante um período de 30

dias, sob alta umidade relativa do ar (~100%), temperatura de 20-25°C e radiação fotossinteticamente ativa de $100 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas.

Após aclimatização, as mudas foram transferidas para sacos plásticos de 1 litro, sendo após um período de 15 dias inoculadas com *F. oxysporum*, conforme o método testado no item 4.3. Todas as plantas receberam água a cada 48 horas e, quinzenalmente, a quantidade de 10ml da solução nutritiva de Long Ashton (BRUNDRETT et al., 1994) modificada (10% de fósforo da concentração original). As plantas ficaram em observação por 90 dias, até o surgimento dos sintomas típicos da fusariose. Nas avaliações determinaram-se presença e/ ou ausência do patógeno, frequência e taxa de colonização micorrízica e desenvolvimento vegetativo. Para verificação da presença e/ ou ausência do patógeno, coletaram-se raízes de plântulas de todos os tratamentos. As raízes coletadas foram lavadas e desinfetadas durante cinco minutos em álcool 50%, lavadas e colocadas em hipoclorito de sódio 1%, permanecendo neste por um período de cinco minutos. Após a lavagem em água destilada, as raízes foram colocadas em placas de Petri com meio Batata Dextrose Agar (BDA), permanecendo em estufa de crescimento durante 48 horas, para avaliação da presença de *F. oxysporum*. Para avaliação do nível de colonização micorrízica, o método utilizado foi o da coloração por azul de tripano, determinado por Gianinazzi – Pearson (1992), sendo este modificado para raízes de videira (PEREIRA & LOVATO, 2002). Para avaliar a taxa e frequência de colonização micorrízica, foram visualizados, em microscópio óptico, 30 fragmentos de raízes de cada planta, montados em lâminas de microscopia. A avaliação do desenvolvimento vegetativo das plantas foi realizada por meio das massas frescas da parte aérea e radicular. Não foi realizado a avaliação da massa seca radicular, pela escassez de material radicular após a retirada para avaliação da colonização micorrízica, presença de *F. oxysporum* no sistema radicular e extração e quantificação de proteínas.

O experimento de avaliação da combinação de fungos micorrízicos arbusculares sobre a fusariose em porta-enxertos de videira foi realizado em blocos completamente casualizados com 12 repetições por tratamento. As massas frescas e secas de parte aérea e radicular foram submetidas à análise de variância, e quando houve efeitos significativos dos tratamentos as médias

foram separadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ao nível de 5% de probabilidade.

4.5. Procedimentos experimentais e analíticos para extração e quantificação de proteínas solúveis totais em raízes de videira.

4.5.1. Extração de proteínas solúveis em raízes de videira

Para a realização do primeiro teste de extração de proteínas, foi utilizado material vegetal proveniente do experimento descrito no item IV.5. Amostras de 0,2 gramas do sistema radicular foram retiradas e armazenadas a -20°C. Após um período de 20 dias, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido em gral de porcelana contendo 200µl de tampão de extração. O tampão de extração utilizado neste primeiro ensaio para extração de proteínas foi o descrito no protocolo do Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetal – LFDGV (ANEXO 1). As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 0°C, ao sobrenadante foi adicionado etanol (2:1), e este foi levado a -20°C durante 1h para precipitação das proteínas. Decorrido este período, as amostras foram novamente centrifugadas durante 20 minutos para a obtenção do extrato bruto. Ao extrato bruto foram adicionados 200µl de tampão de sódio dibásico (ANEXO 1). A solução contendo o extrato bruto e o tampão foi colocada por 5 minutos para banho-maria a 100°C. Após a completa dissolução com o uso do agitador, se necessário, as amostras foram armazenadas a -20°C para a quantificação de proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (1976).

Para a quantificação das proteínas, fez-se necessário o cálculo de uma curva analítica de calibração a partir dos seguintes padrões: 10, 20, 40, 60, 80 e 100µl de solução de albumina de soro bovino. Aos padrões descritos, foram adicionados 100µl de água destilada e 2ml de reagente de Bradford (ANEXO 2). A curva analítica de calibração foi estabelecida a um comprimento de onda de 595nm em espectrofotômetro. Para a quantificação dos teores de proteínas,

adicionaram-se a 100µl da amostra extraída, 2ml do reagente de Bradford, para à leitura em espectofotômetro a 595nm.

4.5.2. Eletroforese de proteínas solúveis

A partir dos resultados obtidos com a quantificação dos teores de proteínas solúveis, as amostras quantificadas foram preparadas para que apresentassem a concentração de 20µl de proteína para cada 100µl da amostra, para uso de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE). A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), (COPELAND, 1994). Com as amostras já preparadas, foi montado o aparato da cuba para eletroforese. A cuba foi totalmente preenchida com tampão de corrida (ANEXO 3), as placas de vidro foram lavadas e vedadas com vaselina e fita autocolante. A confecção e polimerização do gel de poliacrilamida 12% e do STACK gel (ou gel de empilhamento), pode ser consultada no ANEXO 3. Após a completa polimerização do gel, foram adicionados 5µl do tampão de corrida e 25 µl das amostras preparadas em cada poço formado pela retirada do pente de teflon. Na extremidade, foram adicionados 5µl do tampão de corrida e 5µl do padrão protéico (Sigma Markers) com pesos moleculares conhecidos. A corrida foi realizada a temperatura aproximada de 5°C, utilizando fonte para eletroforese Bio-Rad (*Power 300*) com corrente elétrica de 120V nas primeiras 2 horas e 30 minutos (até que as amostras ultrapassassem o gel de empilhamento). Após este período, aumentou-se a corrente elétrica para 240V durante 2 horas e 30 minutos, totalizando 5 horas para toda a eletroforese.

Finalizada a corrida, o gel foi retirado da cuba e imediatamente imerso em solução de fixação, para o início do processo de revelação. Para este primeiro teste, foi utilizado o método de coloração descrito por Creste et al, (2001), modificado de Breidler et al, (1982) (ANEXO 4).

Após o processo de coloração, o gel foi fotografado e analisado, de modo que modificações fossem realizadas nos protocolos, com a finalidade de se obter minimização do acúmulo de compostos fenólicos para a obtenção de melhores resultados nos processos de extração e coloração do gel.

4.5.3. Avaliação de formas de armazenagem de material e tampões para a extração de proteínas.

De acordo com os resultados obtidos no primeiro teste de extração de proteínas solúveis totais, descrito no item 4.5.1, um experimento foi realizado para avaliar o melhor método de armazenagem do material vegetal. As amostras foram pesadas e acondicionadas em tubos eppendorf de 2ml para serem submetidas a três tratamentos e/ou formas de armazenagem. No primeiro, as amostras foram submetidas à temperatura de -20 °C, no segundo as amostras foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido (N₂), e no terceiro se utilizou material vegetal fresco.

Para a determinação do tampão de extração apropriado para a extração de proteínas de material radicular, foram testados em conjunto com as formas de armazenagem três diferentes tampões de extração (ANEXO 1). Os tampões testados são os descritos por Alfenas et al., (1998), Werth, (1985) e o descrito no protocolo de extração de proteínas do Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetal - LFDGV –CCA-UFSC .

O procedimento de extração de proteínas, independentemente do tampão utilizado, foi o mesmo descrito no item 4.5.1. A quantificação do teor de proteínas solúveis totais, bem como, a eletroforese em gel de poliacrilamida, foram realizadas de acordo com os itens 4.5.1 e 4.5.2 respectivamente.

4.5.4. Técnicas para minimização de fenóis

Com a finalidade de se aplicar procedimentos para minimizar o acúmulo de impurezas, visando diminuir a quantidade de arrastes no gel realizou-se um teste com material vegetal radicular do porta-enxerto SO4, coletados no período de aclimatização.

Neste ensaio, a desmontagem de experimento, bem como o manuseio das amostras, ocorreram à temperatura de 16-18°C, no escuro. Após a lavagem das raízes em água corrente, o material foi imerso em solução

antioxidante gelada (0°C) de ácido cítrico e ácido ascórbico (1%). Após a retirada destas da solução, as amostras foram colocadas em água a 0°C para cortes e pesagem, sendo imediatamente transferidas para nitrogênio líquido.

Para a extração de proteínas, as amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram divididas em dois tratamentos. No primeiro, as amostras foram maceradas em gral de porcelana contendo 4,0ml de tampão de extração descrito por Alfenas (1998); no segundo, as amostras foram maceradas em gral de porcelana contendo 4,0 mL de tampão de extração e com resina (Dowes 500 w-x8, cátion Exchange resin 200-400 mesh hydrogen form). Para todos os tratamentos, as amostras foram divididas em três tubos eppendorf, centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 0°C. O sobrenadante foi homogeneizado em tubo de criopreservação e de cada tubo foi retirado 0,75 mL de extrato protéico, adicionando-se a este 1,25 mL de etanol para a precipitação durante 48 horas. Após este período, as amostras foram novamente centrifugadas durante 20 minutos à 0°C para obtenção do extrato bruto. Ao extrato bruto foram adicionados 200µl de tampão de sódio dibásico (ANEXO 1). A solução, contendo o extrato bruto e o tampão, foi levada durante 5 minutos para banho-maria em água fervente. Após a completa dissolução das amostras, estas foram armazenadas a -20°C para a quantificação de proteínas solúveis totais como descrito no item 4.5.1.

4.6. Avaliações de técnicas de coloração do gel de poliacrilamida

Em conjunto a realização dos testes de extração de proteínas, foram avaliadas metodologias de coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata. No primeiro teste de extração de proteínas, descrito no item 4.5.1, a metodologia utilizada foi a descrita por Creste et al., 2001, modificada de Breidler et al., 1982 (ANEXO 4). Em razão do grande número de arrastes, provavelmente decorrentes do acúmulo de fenóis, e da coloração escurecida do gel, foi realizado um segundo teste de coloração, sendo este descrito por Heukeshoven & Dernick (1985). Este teste de coloração foi extraído do Silver Staining Kit Protein (Pharmacia Biotech), (ANEXO 5). As amostras utilizadas

para a eletroforese foram as mesmas para o primeiro e segundo teste de coloração, com a finalidade de se comparar às metodologias testadas.

Como ambos os testes, ocorreu o aparecimento de bandas, com pigmentação do gel escurecida, foi realizado um terceiro teste de coloração, utilizando a metodologia modificada de Alfenas et al., (1998), (ANEXO 6). Também foi realizado, um novo teste de coloração, baseado na metodologia descrita por Blum et al., (1987), (ANEXO 7).

Um outro teste de coloração foi realizado utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250, realizado de acordo com os procedimentos descritos no protocolo de coloração do Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Genético Vegetal CCA- UFSC (ANEXO 7).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de inóculo micorrízico

A produção de esporos micorrízicos foi semelhante entre as três espécies de FMAs multiplicadas, não se detectando efeito do isolado nesta variável. No entanto, os valores percentuais da freqüência de micorrização (F%), taxa de micorrização (M%) e da quantidade de arbúsculos (a%), apresentaram diferenças significativas entre os isolados (Tabela 1).

TABELA 1. Percentuais de freqüência da micorrização (F%), taxa de micorrização (M%) e quantidade de arbúsculos (a%) de plantas de manjerição (*Ocimum basiculum*), associadas a três espécies de fungos micorrízicos arbusculares.

ISOLADO	F%	M%	a%
<i>Glomus clarum</i>	40,50 b ⁽¹⁾	1,50 b	1,00 b
<i>G. etunicatum</i>	40,50 b	0,75 b	0,50 b
<i>Acaulospora</i> sp.	90,00 a	14,00 a	4,00 a

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls

A eficiência do fungo micorrízico em promover o crescimento e desenvolvimento da planta está relacionada ao nível de colonização que ele alcança nas fases iniciais do ciclo de crescimento do hospedeiro (SILVA JÚNIOR & SIQUEIRA, 1998). A maior colonização micorrízica observada no isolado *Acaulospora* sp. também se explica pelo maior percentual de arbúsculos. Um alto percentual de arbúsculos significa maior presença de pontos de troca entre planta e FMAs. Isto está, a princípio, ligado a maiores intensidades de troca de nutrientes e de energia entre a planta e seu simbionte fúngico (SMITH & READ, 1997).

As três espécies isoladas de FMAs multiplicadas colonizaram as raízes do hospedeiro (Tabela 2). Entretanto o isolado de *Acaulospora* sp., embora tenha apresentado produção de esporos semelhante aos demais isolados, obteve taxa e frequência de micorrização e de arbúsculos superiores aos isolados *Glomus clarum* e *G. etunicatum*.

TABELA 2. Amplitude (número de esporos/ 100g de solo) e média do número de esporos viáveis de fungos micorrízicos arbusculares, multiplicados em associação com manjerição (*Ocimum basiculum*).

ISOLADO	AMPLITUDE	MÉDIA
<i>Glomus clarum</i>	316 - 372	85,5 a ⁽¹⁾
<i>G. etunicatum</i>	200 – 424	83,0 a
<i>Acaulospora</i> sp.	296 - 488	88,0 a

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls.

O dado referente ao número de esporos viáveis é de relevância, porque permite estimar a viabilidade do inoculante, visto que o mesmo pode ser armazenado por vários meses, ou mesmo anos, mantendo sua infectividade (BOLAN & ABBOTT, 1983).

5.2. Avaliação de técnicas de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp *herbermontis* em porta-enxertos de videira.

Foram observadas diferenças relacionadas à produção de matéria fresca e seca de parte aérea e radicular para o porta-enxerto SO4, após 90 dias da inoculação do patógeno (Tabela 3).

TABELA 3. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e peso da matéria seca radicular (PSRT) de porta-enxertos de videira SO4, não submetidos a inoculação de *Fusarium oxysporum* (Controle), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), inoculados com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10ml de suspensão de macro e microconídios de *Fusarium oxysporum* (Suspensão de conídios) e pelo método de poda radicular e imersão em solução de *Fusarium oxysporum*.

Formas de inoculação	PSPA	PSRT
	-----g-----	
Controle	5,30 a ⁽¹⁾	2,65 a
Aveia	4,95 a	2,40 a
Suspensão de conídios	3,95 a	1,70 b
Imersão e poda radicular	1,60 b	0,60 c

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls

O método de imersão radicular esteve associado aos menores valores de massa de matéria seca de parte aérea e de raízes no porta-enxerto SO4 (Tabela 3). Os tratamentos com adição de 10 gramas de grãos de aveia infectados e 10ml de suspensão de macro e microconídios não apresentaram diferenças quando comparados ao tratamento controle. O método de inoculação por adição de 10ml de solução de macro e microconídios proporcionou redução da matéria seca radicular, embora menor que o tratamento com imersão e poda radicular. Isto pode ser explicado pelo fato de a solução de macro e microconídios utilizada ser a mesma do tratamento de imersão. Isso reforça o fato do método de imersão com poda radicular ser o mais apropriado para inoculação do patógeno em porta-enxertos de videira. No entanto, devido a este método ter se mostrado muito severo, a inoculação de *F.oxysporum* nos experimentos posteriores se deu por meio da imersão em solução de macro e microconídios de *F.oxysporum*, sem a aplicação de poda radicular.

Após 90 dias da inoculação de *F. oxysporum*, foram observados os primeiros sintomas de murcha na parte aérea, como resposta da planta a presença do patógeno no sistema radicular. O sintoma de murcha foi constatado somente nas plantas inoculadas com *F. oxysporum*. O dano

observado no sistema radicular das plantas do porta-enxerto SO4 está correlacionado a uma menor massa de matéria seca e de parte aérea observada no tratamento de poda e imersão radicular. A presença do patógeno foi constatada no sistema radicular de 91% das plantas inoculadas pelo tratamento de imersão e poda radicular, e 75% das raízes apresentaram sintomas de murcha (Figura 1).

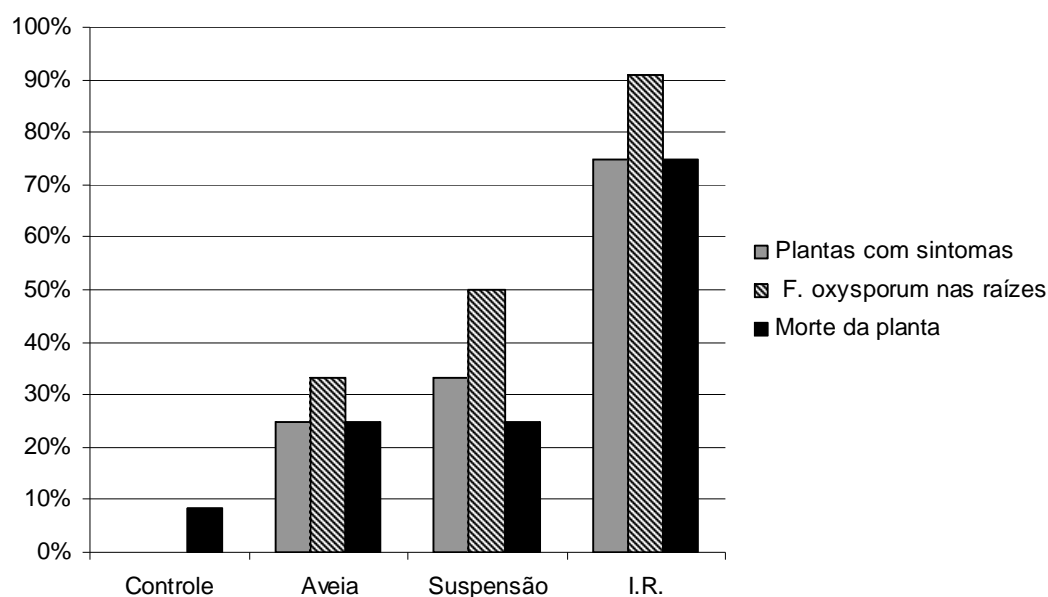


FIGURA 1. Percentuais de presença de *Fusarium oxysporum* no sistema radicular do porta-enxerto de videira SO4, não submetidas a inoculação de *Fusarium oxysporum* (Controle), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10ml de suspensão de macro e microconídios de *Fusarium oxysporum* (Suspensão) e pelo método de poda radicular e imersão em solução de *Fusarium oxysporum* (I.R.).

O número de repetições avaliadas ao final do experimento não foi homogêneo, em razão da alta mortalidade observada nas plantas submetidas a imersão e poda radicular (75%), quando comparados à mortalidade observada nos tratamentos de 10ml de suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* (25%) e 10g de grãos de aveia infectados (25%) (Figura 1).

A produção de matéria seca de parte aérea e radicular, não apresentou diferenças significativas entre as diferentes formas de inoculação do porta-enxerto R-110, para o mesmo período de incidência do patógeno (Tabela 4).

TABELA 4. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e peso da matéria seca radicular (PSRT) de porta-enxertos de videira R-110, não submetidos a inoculação de *Fusarium oxysporum* (Controle), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), inoculados com *Fusarium oxysporum* pelo método de poda radicular e imersão em solução de *Fusarium oxysporum*

Formas de inoculação	PSPA	PSRT
	-----g-----	
Controle	2,00 a ⁽¹⁾	4,00 a
Aveia	2,00 a	4,65 a
Imersão e poda radicular	1,65 a	3,00 a

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls

O desenvolvimento vegetativo do porta-enxerto R-110 não foi prejudicado após 90 dias da inoculação, e não foram constatados sintomas de murcha nas plantas inoculadas. No entanto, mesmo o porta-enxerto R-110 ser classificado como tolerante a fusariose (BORGHEZAN et al., 2003), foi constatada a presença do patógeno em 33 % das raízes inoculadas pelo método de inoculação a partir de grãos de aveia infectados, ocasionando 16% de mortalidade das plantas para este tratamento. Gallotti & Schuck (1991), constataram que a campo, porta-enxertos do grupo *V. rupestris* x *V. berlandieri*, (mesmo grupo do porta-enxerto R-110) tinham se comportado como resistentes em relação a fusariose. Embora haja níveis de resistência, esses autores citam que mesmo os porta-enxertos mais resistentes sucumbem a doença, mas apresentam a vantagem de terem ciclo de vida um pouco mais longo quando comparados aos demais. Andrade et al. (1993) constataram que os porta-enxertos do grupo *V. rupestris* x *V. berlandieri* apresentam resistência intermediária, sob condições controladas, entre os grupos mais suscetíveis e os mais resistentes.

O método de imersão radicular proporcionou a presença do patógeno no sistema radicular em 50% das plantas inoculadas do porta-enxerto R-110, ocasionando morte em todas as plantas na qual foi detectada a presença do patógeno (Figura 2).

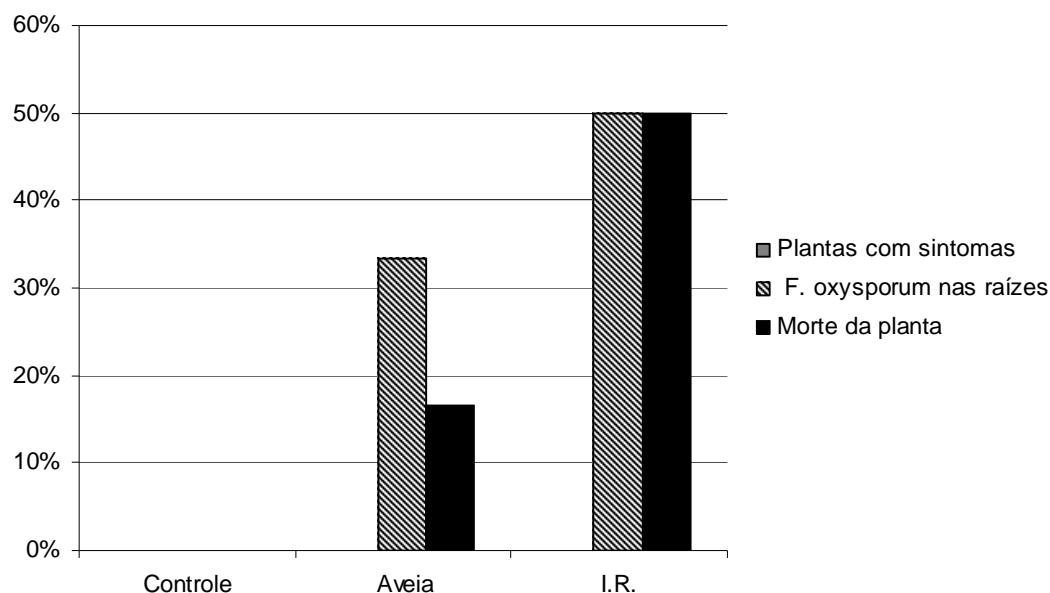


FIGURA 2. Percentuais de presença de *Fusarium oxysporum* no sistema radicular do porta-enxerto de videira R-110, não submetidas a inoculação de *Fusarium oxysporum* (Controle), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pela adição ao substrato de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), inoculadas com *Fusarium oxysporum* pelo método de poda radicular e imersão em solução de *Fusarium oxysporum* (I.R.).

5.3. Ação da combinação de FMA sobre a fusariose em porta-enxertos de videira.

Foram observadas diferenças significativas relacionadas à taxa de micorrização e quantidade de arbúsculos presentes nos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 (Tabela 5).

TABELA 5. Taxa de micorrização (M%) e ocorrência de arbúsculos (a%) no sistema radicular dos porta-enxertos de videira SO4, R-110 e 043-43 submetidos a inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp.) em conjunto a inoculação de *F.oxysporum*.

Porta- enxerto	M%	a%
SO4	23,00 a ⁽¹⁾	4,00 a
R-110	11,00 b	2,50 ab
043-43	10,00 b	2,00 b

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls.

A colonização micorrízica ocorreu somente nos tratamentos que receberam a inoculação com FMAs, evidenciando a não contaminação dos tratamentos não inoculados com FMAs. Nos tratamentos inoculados com FMAs, a taxa de colonização micorrízica apresentou diferenças significativas entre os diferentes porta-enxertos, a presença do patógeno não interferiu na taxa de micorrização. Não foram observadas diferenças significativas relacionadas à taxa de colonização micorrízica na presença do patógeno para o porta-enxerto SO4, suscetível a *F.oxysporum* (Tabela 6). A presença do patógeno não influenciou na quantidade de arbúsculos formados para os porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43.

TABELA 6. Percentuais da taxa de micorrização (M%) e quantidade de arbúsculos (A%), para os porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, na presença ou ausência de *F.oxysporum*.

Porta-enxerto	Micorriza	Patógeno	M%	a%
SO4	FMA	FUS	40,50 b ⁽¹⁾	7,00 b
SO4	FMA	0	30,00 ab	5,00 ab
R-110	FMA	FUS	20,00 ab	4,00 ab
R-110	FMA	0	9,00 b	3,00 b
043-43	FMA	FUS	14,50 b	3,00 b
043-43	FMA	0	15,00 b	3,00 b

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls.

Foi observada uma pequena quantidade de vesículas, em ambos os porta-enxertos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Segundo Silveira (1992), as vesículas são produzidas em geral nas regiões mais antigas da infecção, e são consideradas estruturas de armazenamento, contendo grande quantidade de lipídeos. O número de vesículas frequentemente aumenta em raízes velhas, favorecendo a propagação do fungo. Assim, a baixa quantidade de vesículas explica-se pelo reduzido tempo, de 120 dias, decorrido desde a inoculação até o termino do experimento.

O porta-enxerto SO4 apresentou a maior taxa de micorrização e quantidade de arbúsculos, quando comparado aos porta-enxertos R-110 e 043-43. O maior número de arbúsculos significa maior presença de pontos de troca entre planta e FMAs, possibilitando maior fornecimento de nutrientes e água para a planta. Esse fato associado à maior taxa de micorrização, explica a maior massa fresca de parte aérea nos tratamentos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares nos porta-enxertos avaliados (Figuras 3 e 4).

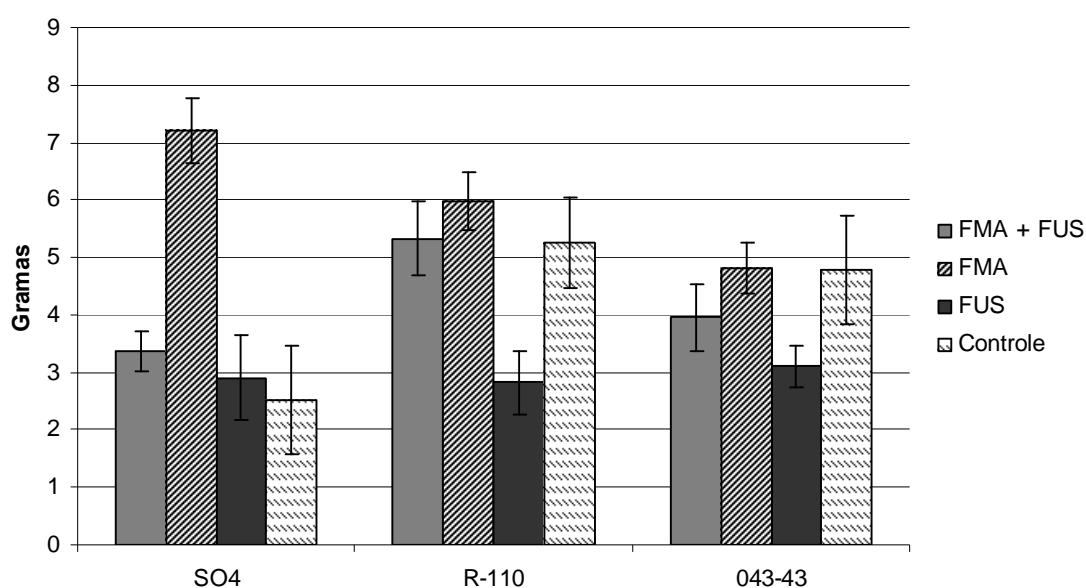


FIGURA 3. Massa fresca de parte aérea do porta-enxertos SO4, do porta-enxerto R-110 e do porta-enxerto 043-43 após 120 dias de permanência em câmara de crescimento, submetidos a inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. (FMA) em conjunto a inoculação de *Fusarium oxysporum* (FMA + FUS), inoculados somente com a mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA),

inoculados somente com *Fusarium oxysporum* (FUS) e não inoculados (Controle).

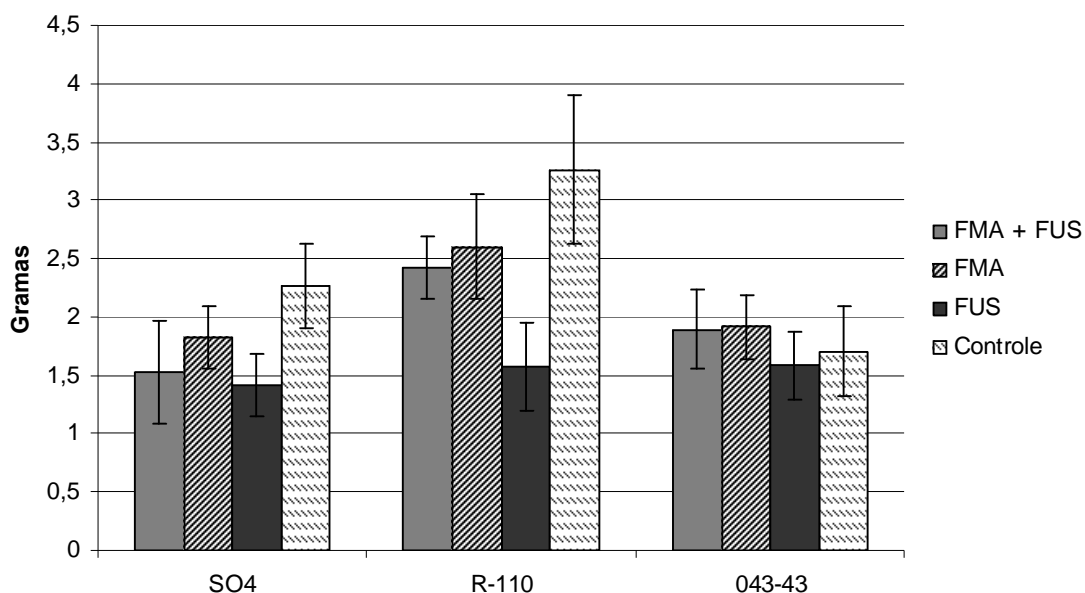


FIGURA 4. Massa fresca radicular do porta-enxertos SO4, do porta-enxerto R-110 e do porta-enxerto 043-43 após 120 dias de permanência em câmara de crescimento, submetidos a inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. (FMA) em conjunto a inoculação de *Fusarium oxysporum* (FMA + FUS), inoculados somente com a mistura de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), inoculados somente com *Fusarium oxysporum* (FUS) e não inoculados (Controle).

A presença do patógeno foi confirmada para todas as plantas inoculadas com *Fusarium oxysporum*, independentemente da presença de FMAs. Não foi constatada presença do patógeno no sistema radicular de plantas não submetidas à inoculação de *Fusarium oxysporum*, comprovando a não contaminação dos tratamentos.

A inoculação de fungos micorrízicos não interferiu significativamente nos valores de matéria fresca de parte aérea e radicular das plantas inoculadas com *F.oxysporum*. As micorrizas são consideradas exemplos clássicos de mutualismo, no entanto nem sempre essas relações se

comportam dessa maneira. Para os FMAs, que são fungos biotróficos obrigatórios, sempre existem benefícios na associação. No entanto, as respostas das plantas à colonização micorrízica podem ser positivas, neutras e negativas (JOHSON et al., 1997). O saldo líquido do custo-benefício para plantas pode variar com o genótipo do hospedeiro, com a fase do ciclo de vida e com a presença ou ausência de nutrientes, pragas e patógenos (CLAY, 1992). Um aspecto importante na análise da resposta das plantas à associação micorrízica é a variável escolhida para medir os benefícios da associação. Enquanto em sistemas naturais, a sobrevivência e a fecundidade são bons indicadores, nos sistemas agrícolas a biomassa ou a produção de frutos são as variáveis mais utilizadas (JOHSON et al., 1997). A não constatação de diferenças significativas relacionadas à biomassa de plantas micorrizadas inoculadas com *Fusarium oxysporum* não significa respostas neutras das plantas. Não se pode utilizar somente a variável biomassa para avaliar os benefícios da associação, visto que nas plantas associadas a fungos micorrízicos arbusculares, o percentual de presença de *F.oxysporum* no sistema radicular, foi inferior ao percentual observado em plantas não micorrizadas, para todos os porta-enxertos avaliados, demonstrando um dos benefícios relacionado a associação micorrízica (Figura 5).

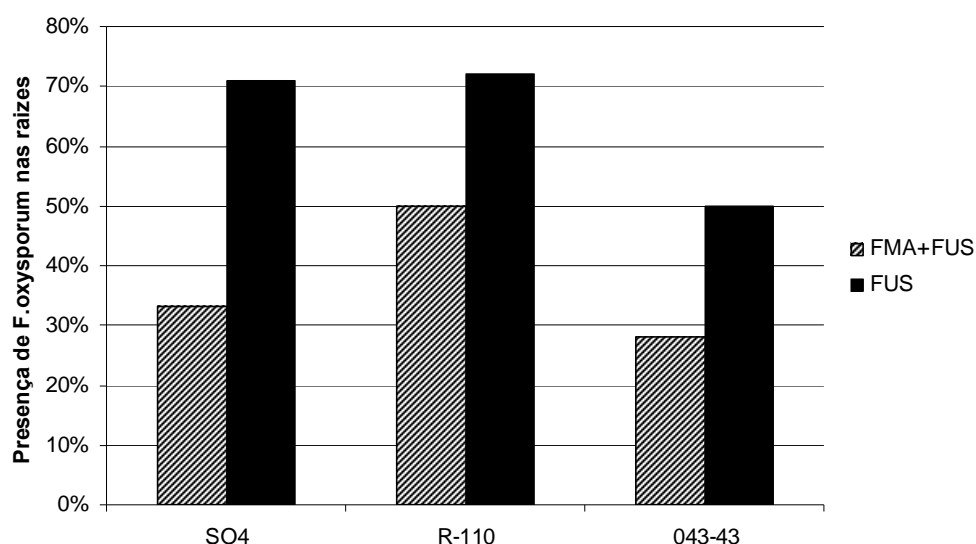


FIGURA 5. Percentuais de presença de *F.oxysporum* nas plantas dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, inoculadas com *F.oxysporum* na presença de

fungos micorrízicos arbusculares (FMA +FUS) e na ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FUS).

Borges *et al.*, (2002), constataram que a inoculação prévia de fungos micorrízicos arbusculares, propiciou um maior desenvolvimento vegetativo e reduziu o índice de doença causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em banana maçã. Petgen *et al.* (1998) concluíram que a inoculação de *Glomus mosseae* incrementa o desenvolvimento do porta-enxerto de videira SO4. O gênero *Gigaspora*, em especial a espécie *Gigaspora margarita* é citada, como sendo uma espécie eficaz quando utilizada no controle biológico (AGOSTINI, 2002). Segundo Souza *et al.* (1995), os FMAs podem estar envolvidos em processos hormonais, interferindo na síntese e translocação de fitohormônios e, com isto, aumentando a emissão de raízes.

As massas frescas radiculares das plantas inoculadas com FMAs do porta-enxerto SO4, não diferiram significativamente da massa fresca observada no tratamento controle, mas foram significativamente superiores aos tratamentos de inoculação de *Fusarium oxysporum* (Figura 4). Isto pode ser explicado pela suscetibilidade do porta-enxerto SO4 ao patógeno, bem como pelo reduzido tempo decorrido desde a inoculação até o término do experimento, insuficiente para que se manifestassem os efeitos benéficos da simbiose.

O porta-enxerto R-110, tolerante à fusariose, apresentou diferenças significativas relacionadas à presença de fungos micorrízicos na produção de massa fresca de parte aérea para as plantas inoculadas com *F.oxysporum*. A presença de FMAs proporcionou incremento na massa fresca de parte aérea das plantas inoculadas com o patógeno, não diferindo do tratamento controle (Figura 3). As plantas do porta-enxerto R-110, referentes ao tratamento de inoculação de *F.oxysporum*, apresentaram as menores massas frescas de parte aérea e radicular, quando comparados as massas frescas de parte aérea e radicular das plantas inoculadas com FMAs, demonstrando efeito benéfico da associação. Silva *et al.* (1999) obtiveram maior massa fresca de raízes no porta-enxerto 101-14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*), microporpagado quando utilizaram a mistura dos FMAs *Scutellospora heterogama* e *Glomus clarum*,

comprovando que os benefícios da simbiose dependem da espécie e isolado de FMAs utilizados, bem como, do nível de tolerância que a planta possui com relação ao patógeno. Büttenbender (2001), verificou tendência de aumento no peso fresco radicular do porta-enxerto 101-14 quando inoculado com FMAs do gênero *Glomus*, um dos que foram utilizados neste experimento (AGOSTINI,2002). Com relação à utilização de fungos micorrízicos em videiras, Deal et al, (1971), realizaram levantamentos, tendo constatado que a presença de altas concentrações de FMAs proporcionava maior vigor a plantas de videira. Os mesmos autores, sugeriram a necessidade da simbiose para melhorias no desenvolvimento e produtividade de plantas.

A matéria fresca de parte aérea do porta-enxerto 043-43, apresentou diferenças significativas nas plantas inoculadas com *F.oxysporum* (Figura 3). Não foram constatadas diferenças relacionadas à massa fresca radicular, das plantas do porta-enxerto 043-43 submetidas a inoculação de *F.oxysporum* (Figura 4). O porta-enxerto 043-43 é considerado resistente a fusariose, no entanto as plantas inoculadas com *Fusarium oxysporum* apresentaram um menor desenvolvimento vegetativo quando comparadas as plantas inoculadas com *F.oxysporum* na presença de fungos micorrízicos e ao tratamento controle.

Foram constatadas diferenças significativas relacionadas à presença do patógeno, valores inferiores de massa fresca de parte aérea estão relacionados à presença do patógeno no sistema radicular. A matéria fresca de parte aérea apresentou valores superiores nos tratamentos de inoculação micorrízica, independentemente da presença do patógeno.

Não foram constatadas diferenças significativas relacionadas aos teores de proteínas solúveis totais, para os porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 submetidos aos diferentes tratamentos de inoculação de fungos micorrízicos e *Fusarium oxysporum*.

5.4. Procedimentos experimentais e analíticos para extração e quantificação de proteínas solúveis totais em raízes de videira.

5.4.1. Extração de proteínas solúveis em raízes de videira

O método de inoculação do patógeno não afetou os teores de proteínas solúveis extraídas do sistema radicular de plantas do porta-enxerto de videira SO4. Foi observado um baixo teor de proteínas solúveis extraíveis, bem como uma grande oscilação nos valores observados, como consequência da utilização de um método de extração não otimizado para material radicular de espécie lenhosa (Tabela 7).

TABELA 7. Peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSRT) de plantas do porta-enxerto SO4, não inoculadas com *F.oxysporum* (Controle), inoculadas pelo método de adição de 10g de grãos de aveia infectados (Aveia), 10ml de suspensão de macro e microconídios de *F.oxysporum* (Suspensão de conídios) e por imersão e poda radicular.

Formas de inoculação	mg proteína/ grama raiz
Controle	80,00 a ⁽¹⁾
Aveia	58,50 a
Suspensão de conídios	71,50 a
Imersão e poda	8,00 a

⁽¹⁾ em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls

O número de repetições utilizados para a realização deste teste preliminar foi homogêneo, mas em razão da pequena quantidade de material vegetal utilizada na extração, algumas amostras apresentaram valores de leitura negativos, sendo necessária sua remoção o que tornou variável o número de repetições por tratamento. A utilização de um protocolo ainda não ajustado para o material radicular, causou de *Vitis vinifera* propiciou uma oscilação nos teores de proteínas observados em plantas da mesma variedade submetidas ao mesmo tratamento. A utilização de um protocolo não específico para material radicular, causou a formação de grande quantidade de

compostos fenólicos no momento da extração, vindo isto a prejudicar a quantificação de proteínas e, posteriormente, a análise do gel de poliacrilamida, por causa da alta quantidade de arrastes observados.

Os resultados observados nos testes preliminares indicaram a necessidade da otimização de um protocolo para material radicular de *Vitis vinifera*, principalmente relacionado à aplicação de técnicas que visem à minimização de formação de compostos fenólicos, armazenagem de material vegetal, determinação de tampão de extração mais apropriado para material radicular, eletroforese e coloração do gel de poliacrilamida.

5.4.2. Eletroforese de proteínas solúveis –Testes preliminares.

Os resultados obtidos com a extração e quantificação de proteínas dos testes preliminares, as amostras obtidas foram preparadas para que apresentassem a concentração final de 20µl de proteína para 100µl da amostra. Foram realizados ensaios eletroforéticos com material proveniente da extração de proteínas dos testes preliminares. A análise dos géis de poliacrilamida referentes aos ensaios eletroforéticos, realizados antes da aplicação de técnicas que visaram à minimização de compostos fenólicos, mostraram uma baixa quantidade de bandas protéicas e uma grande quantidade de arrastes. Tais resultados indicam a presença de compostos fenólicos, mostrando que as amostras apresentavam alto grau de impurezas. A não detecção de bandas se dá pela baixa concentração da amostra, e os arrastes decorrentes da degradação das proteínas (ALFENAS & BRUNE, 1998),

A eletroforese realizada nestes primeiros ensaios tinha como objetivo a determinação do peso molecular das proteínas extraídas das amostras. No entanto, devido aos altos teores de impurezas e a presença de compostos fenólicos, a técnica serviu para demonstrar que alternativas de purificação e redução de formação de compostos fenólicos deveriam ser realizadas. Os resultados obtidos indicaram a necessidade de ajustes no protocolo de extração, bem como no protocolo de coloração. Ficou evidente a necessidade

da busca de alternativas para a minimização da formação de compostos fenólicos. Como alternativa para a não detecção de bandas, a solução encontrada foi o aumento da concentração de proteínas para 40µl de proteína para cada 100µl da amostra. Para minimização da formação de compostos fenólicos, buscaram-se melhorias nos métodos de armazenagem do material vegetal, utilização de substância anti-oxidante no momento da desmontagem do experimento e, no momento da extração, trabalho sob condições de baixa luminosidade e temperatura. Também foi observado que os reagentes devem ser preparados no momento da sua utilização, ou na noite anterior para aqueles que necessitam de refrigeração. A manutenção do material vegetal e das amostras deve ser realizada sob baixas temperaturas, (placas de gelo). As técnicas utilizadas com o objetivo de minimização de compostos fenólicos estão descritas nos itens, 4.5.3 e 4.5.4 da seção Material e Métodos.

5.4.3. Avaliação de formas de armazenagem de material e tampões para a extração de proteínas.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares de extração de proteínas foram realizados testes para encontrar a melhor forma de armazenagem de material radicular, bem como para a determinação de um tampão apropriado para a extração de proteínas de material radicular de *Vitis vinifera*.

O método de armazenagem que propiciou a menor formação de compostos fenólicos, ocasionando a maior detecção de teores de proteínas solúveis totais foi o de imersão em nitrogênio líquido (N₂). Os tampões de extração testados não diferiram entre si, mas foi detectado efeito da interação entre o método de armazenagem e tampão de extração utilizado (Tabela 8).

TABELA 8. Teores de proteínas solúveis totais de material radicular de *Vitis vinifera*, sob três formas de armazenagem, extraídos a partir dos tampões descritos por LFDGV (tampão utilizado no Laboratório de Fisiologia e

Desenvolvimento Genético Vegetal CCA- UFSC), Alfenas *et al.*, (1998) e Werth, (1985).

Método de armazenagem	LFDGV Médias	Alfenas <i>et al</i> , (1998)	Werth, (1985)	
	----- µg proteína /g de raiz -----			
Fresco	74 ab ⁽¹⁾	188 abc	330 c	197 A
-20 °C	318 bc	182 abc	36 a	178 A
N ₂ líquido	137 abc	218 abc	243 abc	200 A
Médias	176 A	196 A	203 A	

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls.

Os resultados dos ensaios eletroforéticos relacionados ao tipo de armazenagem de material radicular indicaram que o método de armazenagem a -20 °C proporciona uma contínua degradação das proteínas, favorecendo a formação de compostos fenólicos. Assim, este método foi descartado, mesmo tendo proporcionando valores superiores de teores de proteínas solúveis totais, quando utilizado o tampão de extração descrito por LFDGV. As análises realizadas para avaliação dos tampões demonstraram que os teores de proteínas extraíveis pelo tampão proposto por Werth (1985), foram superiores aos tampões propostos por LFDGV e Alfenas *et al.*, (1998), quando utilizados na extração material radicular fresco. O tampão de extração proposto por Werth (1985), foi descartado por causa das diferenças significativas entre os teores de proteínas solúveis detectados em plantas da mesma variedade submetidas ao mesmo tratamento.

Em função dos resultados, o tampão de extração descrito por Alfenas *et al.* (1998) foi escolhido para a continuidade dos trabalhos, por estar relacionado à extração de teores de proteínas semelhantes para material fresco e conservado em nitrogênio líquido (N₂), bem como por não ter proporcionado diferenças significativas entre plantas da mesma variedade e tratamento.

5.4.4. Técnica empregadas para minimização de fenóis.

Após avanços nos resultados de extração e eletroforese de proteínas, provavelmente relacionados a melhorias na forma de armazenagem de material, foi necessário diminuir os arrastes provenientes do acúmulo de compostos fenólicos.

Nos ensaios eletroforéticos realizados até esta etapa, foram observados arrastes provenientes do acúmulo de compostos fenólicos. Com o objetivo de minimizar a formação de compostos fenólicos, no momento da extração foi adicionado resina (XXXX), ao tampão de extração.

Com relação ao teor de proteínas solúveis totais, não foi detectado, efeito da resina relacionada ao maior teor de proteínas solúveis extraíveis (Tabela 9).

TABELA 9. Teores de proteínas solúveis totais de material radicular de *Vitis vinifera*, extraído com resina (XXXX) adicionada ao tampão (Resina), e somente com o tampão (Controle).

Tratamento	µg proteína /g de raiz
Resina	240 a ⁽¹⁾
Controle	292 a

⁽¹⁾ Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Newman-Keuls.

Foi observado um grande número de arrastes nas amostras submetidas à presença da resina, comprovando que a aplicação de resina no momento da extração não minimizou a formação de compostos fenólicos, assim como não propiciou um maior teor de proteínas solúveis totais extraíveis.

5.6.5. Avaliações de técnicas de coloração do gel de poliacrilamida.

Em conjunto com a realização dos testes de extração de proteínas, que visaram ao ajuste do protocolo para material radicular de *Vitis vinifera*, foram avaliadas metodologias de coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata e Coomassie Brilliant Blue R-250.

No primeiro teste de extração de proteínas, descrito no item 4.6. utilizou-se a metodologia descrita por Creste *et al.* (2001), modificada de Breidler *et al.* (1982). Foi observado um grande número de arrastes, provavelmente decorrentes do acúmulo de compostos fenólicos, ocasionando o escurecimento do gel de poliacrilamida, bem como o aparecimento apenas incipiente de bandas protéicas, decorrentes da baixa concentração de proteínas nas amostras preparadas (ALFENAS & BRUNE, 1998). A partir destes resultados, foi testada a coloração descrita por Heukeshoven & Dernick (1985). Ainda foram observados arrastes decorrentes de acúmulo de compostos fenólicos, indicando a necessidade da purificação das amostras e uma otimização nos protocolos de eletroforese e coloração para material radicular de *Vitis vinifera*. Após os resultados obtidos com as metodologias testadas, foi realizada uma avaliação das metodologias propostas por Alfenas *et al.*, (1998) e por Blum *et al.*, (1987). Os resultados obtidos com as duas metodologias foram satisfatórios, pois foi observado uma pigmentação mais clara do gel e um reduzido número de arrastes, mas ocorreu um fraco aparecimento de bandas. Em razão dos resultados observados nos testes de coloração com nitrato de prata, foi realizado um teste para avaliar a coloração utilizando Coomassie Brilliant Blue R-250. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, por causa dos baixos teores de proteínas solúveis presentes nas amostras.

Os resultados dos testes de coloração com nitrato de prata foram semelhantes, tendo como principais problemas o grande número de arrastes ocasionados pelo acúmulo de compostos fenólicos e a pigmentação escurecida do gel. A extração de proteínas foi totalmente realizada a partir de material radicular de *Vitis vinifera*. Assim como todo material radicular, este apresentava uma grande quantidade de células mortas, propiciando um acúmulo de compostos fenólicos.

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, que visaram à otimização de protocolo de extração e eletroforese de proteínas de material radicular de *Vitis vinifera*, foi determinado que a melhor forma de armazenagem do material radicular de *Vitis vinifera*, era a imersão e conservação em nitrogênio líquido, e o melhor tampão de extração era aquele descrito por Alfenas *et al.*, (1998). Com relação às modificações no protocolo de extração, a principal modificação foi a necessidade da purificação das amostras antes da

eletroforese a partir da re-precipitação destas em TCA (ácido tricloroacético). No preparo das amostras, foram realizadas modificações nas concentrações dos compostos utilizados no preparo do tampão de amostra, bem como pela substituição de 5% de mercaptoetanol por DTT (ditiotretol), mais indicado quando as proteínas se apresentam desnaturadas. No preparo do gel de poliacrilamida, as modificações se deram principalmente na concentração do gel de corrida, de 12 para 10%, e no gel espaçador ou de separação de 4 para 3%. De todas as metodologias de coloração com nitrato de prata avaliadas, a que proporcionou uma pigmentação mais clara do gel, bem como o aparecimento nítido de bandas protéicas foi aquela descrita por Capaldi, (2002).

5.7. Análise da variabilidade do proteoma de material radicular de porta-enxertos de *Vitis vinifera*.

A figura 6, apresenta o perfil protéico de material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, submetidos a tratamentos de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *F.oxysporum*. Para a realização da análise do proteoma de material radicular de *Vitis vinífera*, se fez necessário primeiramente à otimização de procedimentos e técnicas para a minimização de formação de compostos fenólicos, visto que não se encontrou na literatura protocolos específicos para materiais radiculares de espécies lenhosas submetidas a interações entre microorganismos mutualistas e patogênicos. Após ajustes realizados no protocolo de extração e eletroforese de proteínas, houve progressos relacionados à pigmentação mais clara do gel e redução de arrastes, mas o principal avanço foi à observação de bandas protéicas (Figura 6).

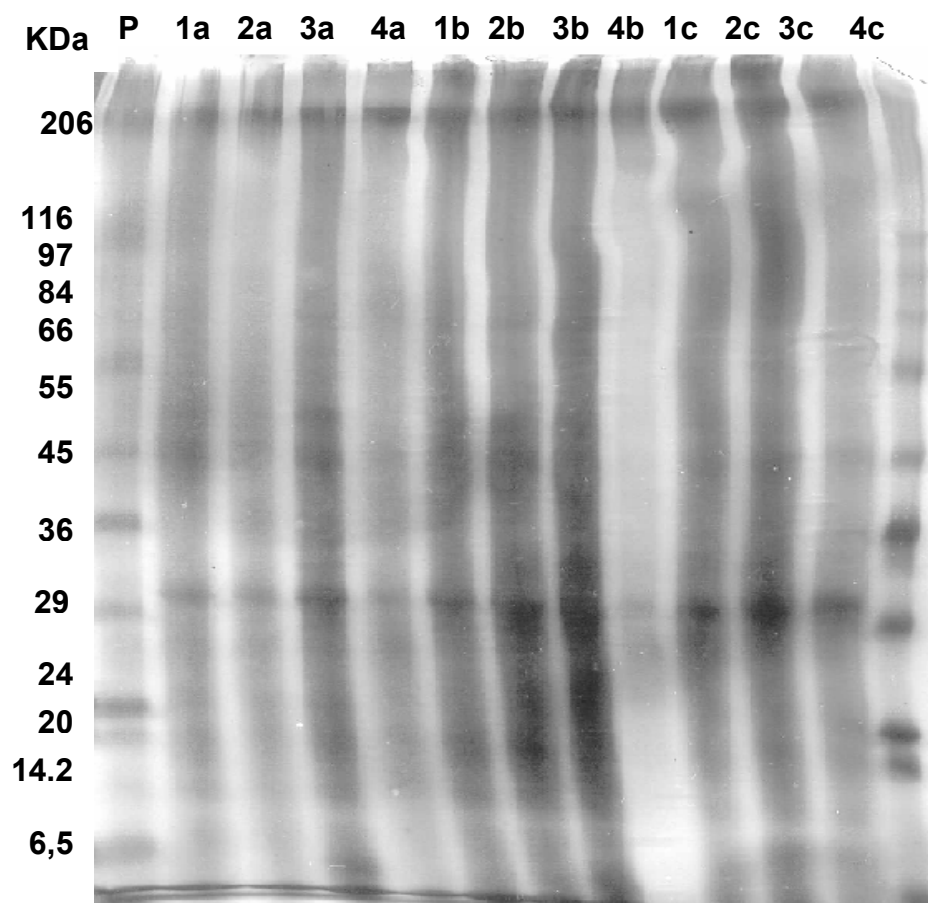


FIGURA 6. Bandas protéicas observadas em raízes dos porta-enxertos SO4 (1a, 2a, 3a e 4a), R-110 (1b, 2b, 3b e 4b) e 043-43 (1c, 2c, 3c e 4c), submetidas aos tratamentos de presença de FMAs e *F.oxysporum* (1a, 1b e

1c), presença de FMAs (2a, 2b e 2c), presença de *F.oxysporum* (3a, 3b e 3c) e tratamento controle (4a, 4b e 4c). O padrão de proteínas esta representado pela letra P, e os valores numéricos representam os pesos moleculares em KDa.

Os resultados da análise do gel de poliacrilamida, após a adoção de técnicas para à redução da formação de compostos fenólicos, foram positivos. Observou-se uma redução significativa no número e na intensidade dos arrastes, mesmo que a presença de compostos fenólicos não tenha sido totalmente eliminada, visto que alguns arrastes ainda foram observados.

Muitos trabalhos sobre as interações entre plantas e microorganismos apontam a formação de compostos fenólicos como resposta da planta à presença de fungos patogênicos e mutualistas. Compostos fenólicos são produzidos rapidamente após a infecção por patógenos, especialmente em variedades resistentes (CAMPOS *et al*, 2004). A resistência do hospedeiro é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, na qual o nível de resistência resulta do somatório das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (ALMEIDA, 2001). Mecanismos de resistência do hospedeiro podem ser divididos em pré- formados e pós-formados (AGRIOS, 1997; PASCHOLATI & LEITE, 1995). Os pré-formados englobam mecanismos de defesa presentes nas plantas antes do contato com o patógeno (cutícula, tricomas, alcalóides glicosídeos, glicosídeos fenólicos, inibidores protéicos, fitotoxinas entre outros). Mecanismos pós-formados (compostos fenólicos), estão ausentes, ou presentes em baixos níveis, antes da infecção, sendo induzidos em resposta à presença do patógeno (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Segundo Duddridge, (1987), a planta mostra respostas de defesa que incluem deposição de compostos fenólicos, formação de papila, espessamento das paredes celulares, entre outras reações. Em alguns casos, a reação da planta limita o desenvolvimento da simbiose micorrízica e conseqüentemente, impede sua efetividade, (DUDDRIDGE 1987).

A formação de compostos fenólicos pelas raízes é apresentada, em diversos estudos, como estimulantes ao desenvolvimento de diversas espécies de FMAs (BAPTISTA & SIQUEIRA, 1994.; TSAI & PHILIPS, 1991). Assim, a formação de compostos fenólicos, cuja presença prejudica a avaliação do gel

de poliacrilamida, está ligada não só ao momento da extração com a maceração do material vegetal, mas também com fenômenos que ocorrem a partir da inoculação do patógeno e do fungo micorrízico.

As análises realizadas, independentemente do porta-enxerto avaliado, mostram maiores intensidade e número de arrastes nos tratamentos de inoculação micorrízica e de *F.oxysporum*, em comparação com o observado nos tratamentos controle (Figura 6). A observação de um maior número de arrastes nos tratamentos de inoculação de *F.oxysporum* e FMAs comprova a formação de compostos fenólicos como resposta da planta à presença de fungos patogênicos e mutualistas. Considerando que a formação dos compostos fenólicos está associada a uma reação de defesa da planta à presença de microorganismos patogênicos ou mutualistas, as técnicas aplicadas somente tiveram o objetivo de minimizar a formação, visto que as técnicas de purificação e re-precipitação de proteínas podem resultar em perdas devido a alta desnaturação de certas proteínas de importância, presentes em baixas concentrações nas amostras.

Em trabalho realizado por Campos (2004), foi constatada correlação positiva entre teores de compostos fenólicos, atividades de peroxidase e a resistência à antracnose. Compostos fenólicos são prontamente oxidados a quinonas, por polifenoloxidasas e peroxidases. Peroxidases são hemiproteínas de oxidoredutase, específicas para aceitor de hidrogênio (ALFENAS, 1998), estando presentes em células animais, em microorganismos e em tecidos vegetais. Não era o objetivo do trabalho realizar análises da atividade de peroxidases, mas é importante mencionar a importância desse tipo de estudo para avaliar interações entre plantas e microorganismos em nível bioquímico.

Algumas dificuldades foram encontradas na análise do material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43. A concentração de proteínas em material radicular é normalmente baixa, havendo a necessidade da maceração de uma grande quantidade de material vegetal, e isso favorece a formação de compostos fenólicos (SOUZA, 2002). Os baixos teores de proteínas extraídos a partir de material radicular proporcionaram uma fraca intensidade de bandas em alguns tratamentos (Figura 6). A partir dessa baixa intensidade, fez-se necessária a concentração de proteínas através da mistura de triplicatas, oriundas da mesma planta, e sua re-precipitação das amostras em TCA

(ácido tricloroacético). O processo de re-precipitação pode resultar em perdas de certas proteínas, bem como em precipitação desigual das amostras. Pequenas diferenças resultantes da metodologia podem existir entre diferentes proteomas (SOUZA, 2002), mas em determinados proteomas a existência de proteínas únicas está associada, muitas vezes, a baixas concentrações protéicas, o que resulta na dificuldade da visualização destas nos géis. Uma alternativa para a resolução deste problema foi o aumento da concentração de proteína na amostra, passando de 20µl para 40µl de proteína para cada 100µl da amostra. Este procedimento pode ter resultado na sobreposição de algumas bandas protéicas que ocorrem em altas concentrações, dificultando a sua individualização e a determinação do peso molecular.

Foi observado efeito significativo da presença de fungos micorrízicos arbusculares sobre os teores de proteínas solúveis extraídos de material radicular de *Vitis vinifera*, independentemente da presença ou ausência do patógeno (Tabela 10).

TABELA 10. Quadrados médios para os teores de proteínas encontrados no material radicular de *Vitis vinifera*, para as fontes de variação, conforme os graus de liberdade.

Fontes de variação	G.L	Quadrado Médio
Porta-enxerto	2	4637 ^{ns}
FMA	1	123527*
FUS	1	33994 ^{ns}
Porta-enxerto x FMA	2	4239 ^{ns}
Porta-enxerto x FUS	2	1863 ^{ns}
FMA x FUS	1	2549 ^{ns}
Porta-enxerto x FMA x FUS	2	2712 ^{ns}
Resíduo	22	10072 ^{ns}

*e^{ns}: significativo e não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade de erro, respectivamente

Houve diferenças significativas nos teores de proteínas em materiais radiculares de *Trifolium pratense* L. colonizado por *Glomus mosseae*, embora mudanças na expressão de polipeptídeos durante o desenvolvimento do fungo micorrízico possam ocorrer em níveis baixos (ARINES, et al.,1993). Em trabalho de revisão realizado por Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi (1995)

aumentos na concentração de proteínas em extratos radiculares de plantas colonizadas por FMAs são citados como frequentes. O efeito do nível de P (fósforo) no solo, é destacado por vários autores como regulador e estimulante da ativação de proteínas e enzimas (SANTOS et al, 2001; LAMBAIS & MEHDY, 1995; SMITH et al.;1985; EPSTEIN, 1975). No entanto, outros autores demonstram que as atividades de fosfatases alcalinas são realçadas quando a planta hospedeira cresce em solo deficiente em P (GIANINAZZI et al., 1992). Lambais (1996) menciona que a expressão de proteínas associadas à presença de fungos micorrízicos é regulada pelo nível de P nos tecidos da planta e não pelo nível de P disponível no solo. Neste trabalho foi usado um só substrato, supondo-se então o mesmo nível de P disponível para todas as plantas.

A possível atuação de proteínas de defesa vegetal no controle e crescimento intrarradicular de FMAs tem levado a realização de diversos estudos sobre a regulação destas proteínas. Durante o desenvolvimento de FMAs, diferentes isoformas de quitinase apresentam expressão diferencial, mas seu papel na associação mutualista ainda não é conhecido. As atividades de quitinases são suprimidas nos estágios iniciais do desenvolvimento de FMAs e induzidas posteriormente (LAMBAIS & MEHDY, 1998), o que explica o maior teor de proteínas solúveis totais observadas nos tratamentos de inoculação micorrízica, visto que os teores observados no tratamento controle não diferiram do tratamento de inoculação de *F.oxysporum*. Durante os estágios iniciais de desenvolvimento de FMAs em alfafa colonizada por *Glomus intraradices*, foram observados aumentos na atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase e chalcona isomerase, e nos níveis de seus respectivos mRNAs nas regiões colonizadas da raiz (VOLPIN et al, 1995). Foi observado que no início da associação micorrízica entre raízes de alfafa e *Glomus vesiforme* o nível de mRNAs foi induzido, quando comparado aos níveis destes mRNAs em raízes não micorrizadas (HARRISON & DIXON, 1993). Observou-se em raízes de soja colonizadas por diferentes isolados micorrízicos, que apresentaram elevadas taxas de micorrização, a indução na atividade de chalcona isomerase, o que não foi observado em plantas não micorrizadas, ou quando apresentaram baixos teores de micorrização (LAMBAIS & MEHDY, 1996).

Não foram detectadas diferenças relacionadas ao efeito do patógeno e do porta-enxerto com o acúmulo de proteínas solúveis (Figura 7).

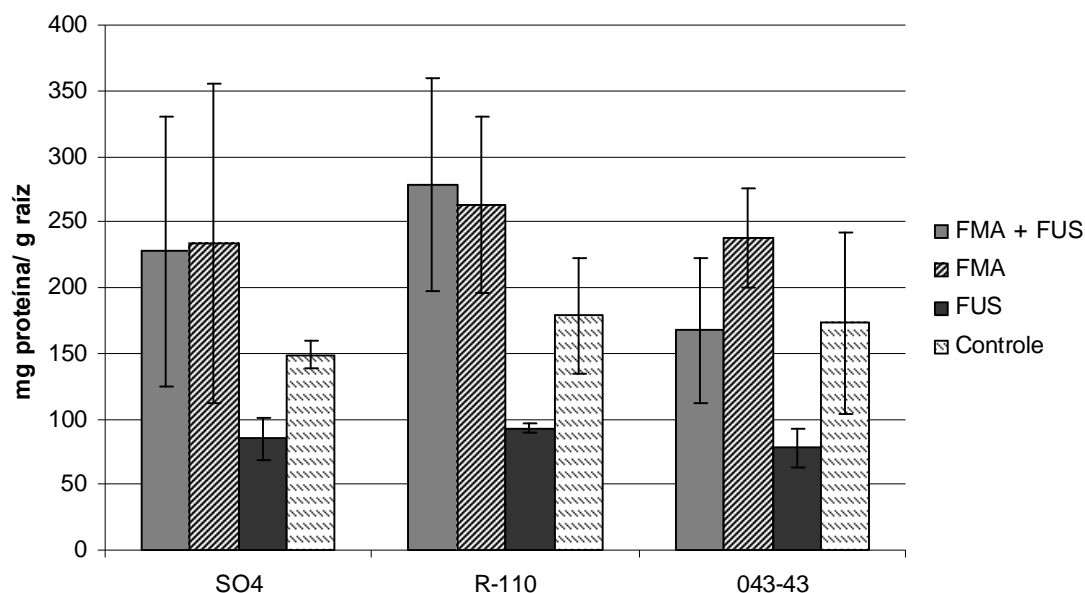


FIGURA 7. Teores de proteínas solúveis totais extraídos de material radicular de *Vitis vinifera* expressos em microgramas de proteína presentes por grama de material radicular (mg proteína/ g raiz) dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, submetidos a tratamentos de inoculação de *F.oxysporum* na presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA + FUS), inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), inoculação de *F.oxysporum* (FUS) e tratamento controle.

Mesmo não sendo tendo sido detectadas diferenças significativas entre tratamentos nos teores de proteínas solúveis totais, as tendências observadas foram relacionadas à distribuição dos perfis protéicos nos proteomas de material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, submetidos a diferentes tratamentos de inoculação de FMAs e *F.oxysporum*. Em muitos casos, a resistência local é manifestada como uma resposta de hipersensibilidade, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões que restringem o crescimento e/ ou o desenvolvimento do patógeno, (DIXON & HARRINSON, 1992). Associada à resposta de um grupo diverso de genes

induz a formação de proteínas relacionadas à patogênese (RP) (DURNER et al, 1997). A indução de RPs é geralmente acompanhada pelo desenvolvimento da resistência local à infecção causada por agentes patogênicos ou mutualistas (LINTHORST, 1991). Segundo Mohhamed & Sehgal (1997), proteínas relacionadas à patogênese têm um papel importante na reação da resistência das plantas a fitopatógenos. Neste trabalho, a inoculação de fungos mutualistas e patogênico induziu a formação de proteínas específicas não observadas no tratamento controle. O perfil protéico das proteínas radiculares dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43, submetidos a tratamentos de inoculação de FMAs e *F.oxysporum*, separados por eletroforese (SDS-PAGE), e detectados por impregnação por prata está representado conforme esquema apresentado na figura 8.

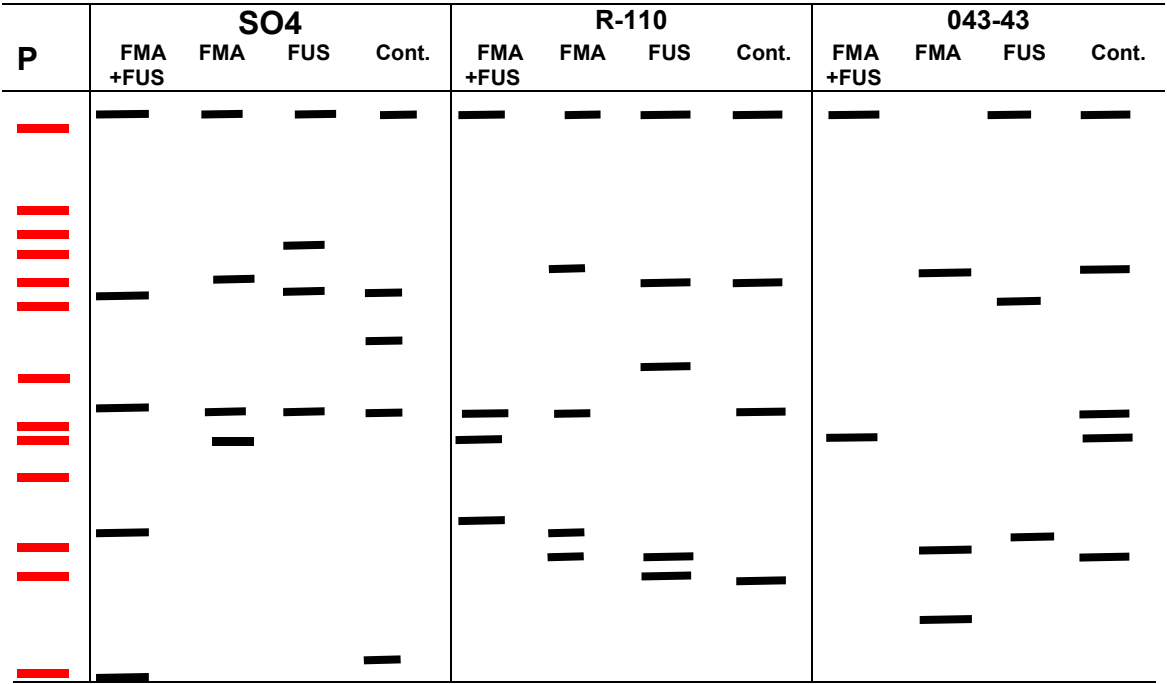


FIGURA 8. Esquema do gel de poliacrilamida apresentado na figura 8. Bandas protéicas observadas a partir de material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 submetidas a tratamentos inoculação micorrízica e de *F.oxysporum* (FMA + FUS), inoculação de fungos micorrízicos (FMA), inoculação de *F.oxysporum* (FUS) e tratamento controle. O padrão de proteínas esta representado pela letra P.

As proteínas do material radicular dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43 apresentam massa molecular aparente variando de 5,4 KDa a 226,4 KDa (Tabelas 11, 12 e 13). Em trabalho de avaliação do proteoma do fluido intercelular de raízes de *Saccharum officinarum* micorrizadas por *Glomus clarum*, as massas moleculares das proteínas radiculares apresentaram valores variando de 10 KDa a 100 KDa (SOUZA, 2002).

No perfil protéico do porta-enxerto SO4, foram detectadas 17 proteínas, sendo 28% destas referentes ao tratamento de interação entre FMAs e *F.oxysporum*, 22% referentes aos tratamentos de inoculação individual de fungos micorrízicos e *F.oxysporum* e 28% referentes ao tratamento controle. O perfil protéico do porta-enxerto R-110 apresentou 18 proteínas, sendo 22% referentes ao tratamento de interação entre FMAs e *F.oxysporum*, 28% relacionadas a inoculação de FMAs e *F.oxysporum* e 22% relacionadas ao tratamento controle. Para o porta-enxerto 043-43, um menor número de bandas protéicas foram observadas, ao todo, 13 bandas. Destas, 15% são referentes ao tratamento de interação, 23% referentes ao tratamento de inoculação de fungos micorrízicos e inoculação de *F.oxysporum* e 38% estão relacionadas ao tratamento controle.

Deve-se considerar que a presença de determinada proteína em um organismo é o produto direto da expressão gênica (BINNECK et al., 2002). Amostras que apresentam a mesma banda em determinada posição possuem o mesmo alelo naquele locus, e quanto maior o número de bandas protéicas coincidentes, maior é a similaridade entre os genótipos (STOYANONA, 1996). A análise dos pesos moleculares dos tratamentos-controle reforça as diferenças genéticas na comparação dos porta-enxertos SO4, R-110 e 043-43. Os porta-enxertos avaliados apresentaram somente um padrão protéico coincidente de bandas de alto peso molecular, variando de 207,5 KDa a 226,4 KDa (Tabelas 11, 12 e 13).

Os porta-enxertos SO4 (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*) e R-110 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*), respectivamente suscetível e tolerante a fusariose, apresentam um padrão protéico semelhante, visto que a variedade *Vitis berlandieri* foi utilizada no cruzamento de ambos os porta-enxertos. Em análise comparativa do proteoma de material radicular, foi observado um perfil protéico

de peso molecular variando de 25,9 KDa a 43,4 KDa para o porta-enxerto SO4 (Tabela 11) e de peso molecular variando entre 23,1 KDa e 39,8 KDa (Tabela 12) para o porta-enxerto R-110. Este perfil protéico não foi observado no proteoma do porta-enxerto 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). A característica de suscetibilidade e tolerância dos porta-enxertos SO4 e R-110 pode estar relacionada aquele perfil protéico, visto que a resistência a fusariose é função dos materiais utilizados nos cruzamentos (SILVA, 2003; ANDRADE et al., 1993). Assim, as bandas coincidentes observadas nos porta-enxertos SO4 e R-110 podem ser reflexos da ausência de resistência a fusariose, ou podem ser somente o produto da expressão gênica, associada a uma reação da planta à presença do patógeno ou mutualista. Também podem ser bandas provenientes do patógeno ou mutualista que não se expressam quando associadas a genótipos resistentes. A inexistência de trabalhos com proteínas em raízes de plantas lenhosas reforça a necessidade de estudos sobre a interação desse tipo de plantas com fungos mutualistas e patogênicos.

A tabela 11 apresenta os valores de pesos moleculares das bandas protéicas observadas para o porta-enxerto SO4. O proteoma para o porta-enxerto SO4 apresenta perfis protéicos de distribuição de bandas muito semelhantes com massas moleculares variando de 5,4 KDa a 207,5 KDa. No entanto, constatou-se a presença de uma banda protéica de peso molecular de 108,4 KDa relacionada ao tratamento de interação entre FMAs e *F.oxysporum* e uma banda de peso molecular de 72,4 KDa relacionada ao tratamento de inoculação do patógeno (Tabela 11). Estas bandas não foram observadas nos tratamentos de inoculação micorrízica e controle, indicando que sua expressão está ligada à presença do patógeno no porta-enxerto suscetível.

TABELA 11. Pesos moleculares das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto SO4.

Peso Molecular Padrão (KDa)	FMA+ FUS	Porta-enxerto SO4		Controle
		FMA	FUS	
205,0		196,33	207,49	207,49
116,0	108,39			
97,0				
84,0			72,44	
66,0	64,56	64,56	60,95	68,39
55,0				
45,0				43,35
36,0	34,51			
29,0		31,69	31,69	30,76
24,0		25,94		
20,0	20,65			
14,2				
6,5	6,99			5,4

As proteínas de massas moleculares variando de 30,7 KDa a 34,5 KDa, 60,9 KDa a 68,4 KDa e de 108,4 KDa a 207,5 KDa foram detectadas em todos os tratamentos, representando, em média 67% do total de proteínas observadas no material radicular do porta-enxerto SO4. Essas bandas protéicas, por estarem presentes em todos os tratamentos avaliados, são de provável origem vegetal. Foi observada uma banda de peso molecular de 34,5 KDa no tratamento que avaliou a interação entre FMAs e *F.oxysporum*. Como esta banda não foi observada nos demais tratamentos aplicados ao porta-enxerto SO4, sua presença deve resultar de expressão gênica resultante da interação planta-patógeno-mutualista. Em trabalho realizado por Souza (2002), foi constatada a presença de uma proteína de peso molecular de 34 KDa, em material radicular de plantas de *Saccharum officinarum*, inoculadas com *G.etunicatum*, cultivada em condições de alto teor de P. Segundo este autor, esta é possivelmente uma proteína modulada pela concentração de P, ou uma proteína fungica induzida pela presença de P. Observou-se a presença de uma proteína de massa molecular de 25,9 KDa, presente no material radicular das

plantas do porta-enxertos SO4, inoculadas com FMAs. Esta proteína pode ser de origem fúngica ou induzida em resposta a interação com a associação mutualista. Souza (2002), constatou a presença de uma proteína de peso molecular de 25 KDa, no fluido intercelular de raízes inoculadas com *Glomus clarum*, um dos FMAs utilizados nos tratamentos de inoculação de FMAs neste trabalho.

Assim como em várias interações planta- microorganismo, sinais moleculares podem ser reconhecidos na membrana plasmática e transmitidos através de mensageiros secundários até sítios de transcrição gênica, regulando o processo de síntese. Em FMAs, essa regulação diferencial de genes vegetais fúngicos específicos seria responsável pelo controle do desenvolvimento e funcionamento da associação mutualista. O estudo dos processos de sinalização e transdução de sinais em FMAs são bastante complexos, pois as diferentes etapas dos processos de infecção, colonização e troca de nutrientes, são provavelmente reguladas por uma troca permanente de sinais entre os simbioses (HARRISON, 1999). A expressão diferencial de vários genes /proteínas tem sido observada em raízes colonizadas por FMAs. Foi observada a indução da expressão de quatro genes em condições de deficiência de P em *Medicago truncatula*, suprimidas após a colonização da raiz por fungos micorrízicos arbusculares (HARRISON, 1999).

O porta-enxerto R-110 apresentou bandas protéicas de peso molecular variando entre 78,8 KDa e 83,3 KDa para os tratamentos de inoculação isolada de FMAs, *F.oxysporum* e tratamento controle (Tabela 12). Não foi observado neste perfil protéico bandas relacionadas ao tratamento de interação entre porta-enxertos e microorganismos. No entanto, foi observado uma banda de peso molecular de 23,1 KDa relativa ao tratamento de interação entre FMAs e *F.oxysporum*, não observada nos demais tratamentos.

TABELA 12. Pesos moleculares das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto R-110.

Peso Molecular Padrão (KDa)	FMA+ FUS	Porta-enxerto R-110		Controle
FMA	FUS			
205,0	207,49	213,79	201,83	207,49
116,0				
97,0				
84,0		83,36	78,88	78,88
66,0				
55,0				
45,0				
36,0			39,81	
29,0	32,58	31,69		27,47
24,0	23,12			
20,0				
14,2	12,7	14,65	11,66	11,66
6,5		13,45	11,04	

As regulações nas interações planta patógeno e/ou mutualista podem se dar por características inerentes a planta ou por alterações bioquímicas durante o processo de infecção ou associação (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Assim, a expressão protéica de peso molecular de 23,1 KDa observada pode ser produto da indução sistêmica ou local na planta, em resposta as interações planta-patógeno-mutualista. Assim como ocorreu para o porta-enxerto SO4, esta proteína de peso molecular de 23,1 KDa pode ser de origem fúngica ou uma proteína vegetal induzida em resposta a interação.

Uma proteína de peso molecular de 13,4 KDa foi observada no material radicular de plantas inoculadas com FMAs, e uma proteína de peso molecular de 11 KDa foi observada no tratamento de inoculação de *F.oxysporum* no porta-enxerto R-110. Essas proteínas, não observadas nos demais tratamentos, podem ser proteínas vegetais induzidas pela presença do FMA ou patógeno, ou ainda proteínas fúngicas induzidas pela interação do porta-enxerto com os FMAs ou do porta-enxerto com o patógeno. As proteínas de massas moleculares variando entre 11,6 KDa e 12,7 KDa, 27,5 KDa e 39,8

KDa, bem como as de peso molecular variando entre 201,8 KDa e 207,49 KDa foram detectadas em todos os tratamentos, representando em média 67% das proteínas observadas no material radicular do porta-enxerto R-110.

O porta-enxerto 043-43 apresentou uma banda de peso molecular de 68,3 KDa, relativa ao tratamento de inoculação a *F.oxysporum* (Tabela 13). Esta banda não foi observada nem no tratamento controle, nem nos tratamentos de inoculação micorrízica, demonstrando que sua presença é resultado da expressão gênica da interação planta-patógeno. A invasão dos tecidos vegetais por microorganismos patogênicos é regulada por várias características inerentes à planta ou por alterações bioquímicas durante o processo de infecção (PASCHOLATI & LEITE, 1995). A proteína de peso molecular de 17,9 KDa, presente somente no material radicular de plantas colonizadas por FMAs no porta-enxerto 043-43, é possivelmente uma proteína vegetal induzida pela associação com FMAs (Tabela 13). Para o porta-enxerto 043-43, foi constatado que 31% das proteínas observadas foram detectadas em todos os tratamentos, sendo provável que estas sejam proteínas de origem vegetal. O porta-enxerto 043-43 resistente a fusariose não apresentou perfis protéicos variando de 25,2 KDa a 43,4 KDa, como observado para os porta-enxertos SO4 e R-110 (Tabela 13). A ausência deste perfil protéico pode estar associada a resistência do porta-enxerto 043-43 a fusariose.

TABELA 13. Pesos moleculares apreentados em KDa, das bandas protéicas observadas no gel de poliacrilamida para o porta- enxerto 043-43

Peso Molecular Padrão (KDa)	FMA+ FUS	Porta-enxerto 043-43		Controle
		FMA	FUS	
205,0	219,78		207,49	226,44
116,0				
97,0				
84,0		81,09		83,36
66,0			68,39	
55,0				
45,0				
36,0				
29,0				
24,0				25,23
20,0	22,49	22,49	21,87	18,96

14,2 6,5	17,9	14,65
-------------	------	-------

As bandas protéicas no gel da figura 6, evidenciam a presença de proteínas específicas, produtos da interação entre porta-enxertos e microorganismos fitopatogênicos e mutualistas. No entanto, os dados apresentados são insuficientes para determinar se os pesos moleculares determinados estão associados a uma resposta de hipersensibilidade da planta à presença do patógeno ou mutualista, ou se com a expressão direta do genótipo do patógeno ou mutualista, independente da interação com o porta-enxerto. Para a compreensão dos mecanismos que regulam as interações entre FMAs e microorganismos patogênicos, várias técnicas têm sido usadas (HARRISON, 1999). As comparações iniciais dos perfis de proteínas radiculares presentes em plantas colonizadas por FMAs e fungos fitopatogênicos indicam a presença de novas proteínas em raízes colonizadas e infectadas, mas não permitem a diferenciação entre proteínas fúngicas e proteínas de origem vegetal induzidas pela interação (SAMRA et al., 1997). A expressão gênica pode ser melhor estudada quando são feitas comparações com seqüências genômicas de cada mutualista (SOUZA, 2002; HARRISON, 1999). A identificação de genes diferencialmente regulados em raízes micorrizadas fornece informações iniciais sobre os mecanismos que controlam o desenvolvimento dos FMAs. No entanto, o pleno entendimento de suas funções só ocorre após a identificação das proteínas codificadas por esses genes e após a determinação de suas respectivas funções (HARRISON, 1999).

Estudos de proteomas têm sido utilizados para a identificação de produtos gênicos expressos de forma diferencial em outras interações simbióticas. Usando a técnica de eletroforese bidimensional (2D-PAGE), Natera et al (2000) identificou proteínas bacterianas e de bacteróides envolvidas no metabolismo do Nitrogênio e do Carbono na interação de *Sinorhizobium meliloti* em trevo. Foram identificadas proteínas da membrana peribacterióide em soja, isoladas de nódulos radiculares (PANTER et al., 2000). A análise do proteoma de material radicular para análise de expressão protéica diferencial de raízes colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares e

F.oxysporum, bem como a interação entre estes, é uma abordagem alternativa para o estudo dos mecanismos de regulação dos FMAs.

Em análise de proteínas, um dos principais problemas é a produção de modelos estáveis e reprodutíveis, que possam ser obtidos por uma padronização das condições de cultivo e procedimentos de extração (SOUZA, 2002). Assim, para a realização deste trabalho, primeiramente se objetivou a otimização e padronização do protocolo, ajustando-o para a utilização em material radicular de *Vitis* spp, de modo que este possa ser utilizado em trabalhos posteriores. Para a continuidade dos trabalhos, se propõe a otimização de protocolos para a técnica de eletroforese bidimensional. Esta técnica, resultante da combinação de focalização isoeletrica e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, permitira a separação das proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico e de suas massas moleculares (ROCHA et al., 2005; GUERREIRO et al., 1997; O'FARRELL, 1975).

A eletroforese bidimensional tem sido utilizada para o estabelecimento de mapas-padrão de células, tecidos e para modelos de desenvolvimento. A técnica permite a comparação dos produtos protéicos produzidos por grupos celulares expostos à diferentes condições biológicas. A análise comparativa dos mapas gerado permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas sob diferentes condições (GUERREIRO et al., 1997). A vantagem da eletroforese bidimensional é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa, e a possibilidade de se fazerem análises substantivas da expressão gênica, por meio da comparação dos padrões protéicos (HERBERT et al, 2001). No entanto, dependendo do sistema estudado, dificuldades experimentais são encontradas, tanto para o processamento do extrato protéico como para as análises subseqüentes (WASHBUM & YATES, 2000). Justifica-se a busca de otimização de procedimentos que visaram à minimização de compostos fenólicos e maximização da extração de proteínas em eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), realizada neste trabalho. Os avanços obtidos podem facilitar a otimização da técnica de 2D-PAGE, para uma melhor realização de análises substantivas da expressão gênica em trabalhos subseqüentes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, S. Fungos micorrízicos arbusculares e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia. Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia.

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforesede isoensimas e portein as afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: **Ed. UFV**, 1998. 574p.

ANDRADE, E. R.; SCHUCK, E. ;DAL BÓ,M.A. Avaliação da resistência de *Vitis* spp a *Fusarium oxysporum* f.sp *herbemonts* em condições controladas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.11,p.1287-1290, nov, 1993.

ARINES, J.; PALMA, J.M.; VILARINO, A. comparision of portein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal of read clover. **New Phytologist**, v.123, p.763-768, 1993.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VIDAL, M. T.; DE LA VIÑA, G. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, 12 (10): 837-840, 1992.

BANCO REGIONAL DO DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Vitivinicultura em Santa Catarina- Situação atual e perspectivas. Agência Florianópolis-SC. Gerência de Planejamento. ES2005-1 **VITIVINICULTURA**, 2005.

BINNECK, E.; NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O.A.;BARROS, A.C.S.A.; PESKE, E. S.T. Padrões eletroforéticos de hordeínas e isoensimas para

identificação de cultivares de cevada. **Revista Brasileira de Sementes**. V. 24, nº 1, p.312-321, 2002.

BLAL, B.& GIANINAZZI-PEARSON, V. Interest of mycorrhiza for the production of micropropagated oil palm clones. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 29:39-43,1989.

BLILOU, B. P.; OCAMPO, J.A.; GARRIDO, G. J.M.; Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Mycological Research**, 104, 722-725, 2000.

BLUM, H., H. BEIER, AND H.J. GROSS. Improved silver staining of plant proteins , RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8:93-99, 1987.

BOLAN, N. S. A critical review of the role of mycorrhizae fungi in the uptake of phosphorus by plants.. **Plant and Soil** 134: 189-207, 1991.

BOLAN, N. S.; L. K. ABBOTT. Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. Aust. J. of **Soil Res.** 21, 208-210, 1983.

BORGES, A.J.S.; TRINDADE, A. T.; MATOS, A.P.; GRAZZIOTTI, P.H. Densidade de Inóculo na Interação de Fungos Micorrízicos e *Fusarium* na Banana “Maçã”. Anais da XXV Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, IX reunião brasileira sobre micorrizas, VII Simpósio brasileiro de microbiologia do solo e IV **Reunião brasileira de biologia do solo**. Setembro de 2002.

BORGHEZAN, M; MORAES, L. K.A; MOREIRA, F. M; SILVA, A.L. Propagação in vitro e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira- PAB**, vol. 38, 2003.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUNDRETT, M, L.; PETERSON, L. Pratical Methods in Mycorrhiza Research. **Guelph**, Ontario, Canada, 80p, 1994.

BÜTTENBENDER, D, Utilização de fungos micorrizicos arbusculares na produção de porta-enxertos de videira. Porto Alegre, 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. In: AGOSTINI, S. Fungos micorrízicos arbusculares e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira.. Porto Alegre, 2002. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia. Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia.

CAMPOS. D.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E>P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidases e polifenoloxidase na resistÊncia do feijão à antracnose. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.39, p. 637-643, 2004.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; CAVALCANTE, A.T.; SANTOS, V.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.1099-1106, 2002.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; CAVALCANTE, A.T.; SANTOS, V.F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.1099-1106, 2002.

CLAY, K. Mycophilas and mycorrhizas: comparisons and contrasts. In: READ, D.J.; FITTER, A>H.; ALEXANDER, J.J. (Ed). **Mycorrhizas in ecosystems**. Cambridge UK. CAB International, p.13-25, 1992.

COOPER, K.M.; LÖSEL, D.M. Lipid physiology of vesicular arbuscular mycorrhiza. **New Phytol** 80: 143-151, 1978.

COOPERLAND, R.A. Methods for proteins analysis: A practical guide for laboratory protocols. New York. **Chapman and Hall**, 228p. 1994.

CORDIER, C.; POZO, M.J.; BAREA, J.M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.1017-1028, 1998.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Reporter**, Georgia, v.19, p.1-8, 2001.

DAVID, R.; ITZHAKI, H.; GINZBERG, I.; GAFINI, Y.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.6, p.489-497, 1998.

DEAL, D.R.; BOOTHROYD, C.W.; MAY, W.F. Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, 1971.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.G. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**, San Diego, v.28, p.165-234, 1992.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends Plant Science**. v. 2. p. 266-274, 1997.

EASHBURN, M. P.; YATES, S.R. Analysis of the microbial proteome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 292-297, 2000.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE Como reduzir o uso de agrotóxicos em videira. Disponível em: www.cnpma.embrapa.br. Junho, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA- Produção de vinho e mostro de uva, 2003. Disponível em: www.cnpma.embrapa.br .Junho 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA- Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos – Panorama 2005. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2005-roducao.pdf>. Fevereiro, 2006.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.- EPAGRI. Informativo – Situação da safra 1999/2000 e Previsão da safra 2000/2001. Estação Experimental de Videira, 2000.

EPSTEIN, E. Nutrição mineral das plantas – princípios e perspectivas. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 344p, 1975.

FRÜHLING, M.; ROUSSEL, H.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; PUHLER, A.; PERLICK, A. M. The *Vicia faba* leghemoglobin gene *VfLb29* is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. Mol. **Plant-Microbe Interact.** 10:124-131, 1997.

GALLOTTI, G.J.M. & GRIGOLETTI JR., A. Doenças fúngicas da Videira e seu controle no Estado de santa Catarina. **EMPASC**, Boletim técnico, 51: p. 30-33. 1990.

GALLOTTI, G.J.M.; SCHUCK, E. Ocorrência da fusariose em porta-enxertos de videira. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.4,n.1,p.47-48, mar.1991.

GALZY, R. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vignes. **Bull. O.I.V.**, 650: 378-390, 1985.

GARCIA-GARRIDO J M, OCAMPO J A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **J Exp Bot** 53 (373) 1377-1386. 2002.

GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Cytology, histochemistry and immunocytochemistry as tools for studying structure and function in endomycorrhiza. In: **Methods in Microbiology**, v.24. New York, Academic Press, p. 109-139, 1992.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Recent research into the cellular, molecular and genetical bases of compatible host-fungus interactions in (vesicular) arbuscular endomycorrhiza: approaches and advances. In: *Interactions plants microorganismes*. **International Foundation for Science**, Dakar, Senegal, pp. 253-263, 1992.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S., Proteins and proteins activities in endomycorrhizal simbioses. In: V. Varna & B. Hock (eds.), **Mycorrhiza**. Springer-, 1995.

GUERREIRO, N.; REMOND, J.W.; ROLFE, B.G.; DJORJEVI.C. New Rizobium leguminosarum flavonoid induced proteins reveled by porteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant Microbe Interactoins**, v. 10, n.4, p.506-516, 1997.

HAHN, M., AND MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 322–327, 2001.

HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. Mycorrhizal symbiosis. **Academic Press**, London, 1983.

HARRISON, M. J. Molecular and cellular aspects of mycorrhizae. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, v.50, p.361-389, 1999.

HARRISON, M. J.; DIXON, R. A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** V. 6. p. 643-654, 1993.

HERBERT, B. R. HARRY, J. L. PACKER, N, H. HOOLEY, A.A.; PENDERSEN, S. R. WILIAMS, K. L. What place for polyacrilamide in proteomics ? Trends in Biotechnologist. Oxford, v.19 (supplement). P. 3-9, 2001.

HEUKESHOVEN & DERNICK. Method for staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6.(1985) 103-112 *apud* in Protocol for Pharmacia Biotech precast gels (Silver Staining Kit Protein).

ICEPA. Síntese anual de agricultura de Santa Catarina., p74-75, Florianópolis, 2000.

INVAM. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponível em: <http://invam.caf.wvu.edu/index.html>. Julho, 2005.

JOHNSON, n.n.c.; GRANHAM, J.H.; SMITH, F.A. Functioning mutualism of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. **New Phytologist**, v.135, n.4. p575-585, 1997.

KHUN, G. B.; LOVATEL, J.L.; PREZOTTO, O.P.; RIVALDO, O.F. O cultivo da Videira, informações básicas, (Circular Técnico nº10). Bento Gonçalves, **EMBRAPA /UEPAE**, 44p, 1984.

KREUZ, C.L.; SOUZA, A.; SCHUCK, E.; PETRI, J. L. Avaliação econômica de alternativas de investimentos no agronegócio da uva no meio oeste Catarinense. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.27 no.2 Jaboticabal . 2005.

LAMBAIS, M. R. ; MEHDY, M. C. Spatial Distribution of chitinases and B.1,3 glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, v. 140, n. 1, p. 33-42, 1998.

LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo–planta em micorrizas arbusculares. In: J. O. Siqueira (ed.), **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. UFL., Lavras, MG, pp. 5-38, 1996.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant DR genes in arbuscular mycorrhizae. In: *Current advances in mycorrhizae research* (Podila, G.K. and Douds Jr, D.D., eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 45-59, 1999.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and b-1,3-glucanase expression. **The New Phytologist**, v.134, p.531-538, 1996.

LIMA-DA-SILVA, A. & DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne in vitro. J. Int. Sc. **Vigne Vin**, 29:1-9, 1995.

LIMA-DA-SILVA, A.; SCHUCK, E.; HARISCAN-LAFITTE, P., PARRIZOTO, A. Cultura in vitro do porta-enxerto de videira 043-43 resistente a fusariose. In: I **Simposio Brasileiro de Melhoramento de Frutíferas**, Jaboticabal, SP, p51-53, 1997.

LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.10, p.123-150, 1991.

LOCATELI, I. M. & LOVATO, P.E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta- enxertos de macieira (*Malus spp*) micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** . v.37 n2. Brasília fev.2002.

MALAMY, J.; CARR, J.P.; KLESSIG, D.F. & RASKIN, I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science** 250:1002-4. 1990.

MELLO, L.M.R de. Cadastro Vitícola. In: Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul-1995/2000, Bento Gonçalves, **Embrapa Uva e Vinho/ Ibravin**.3001, Editor Técnico Loiva Maria Ribeiro de Mello (CD Room).

MÉTRAUX, J.-P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W. & INVERARDI, B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science** 250:1004-6. 1990.

MOHAMED, F.; SEHGAL, O.P. Characteristics of pathogenesis-related proteins induced in *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto following viral infection. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.45, p.49-58, 1997.

MOREIRA, F. M. Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira "Paulsen 1103" *in vitro*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2000. 1 v. **Dissertação** (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

NATERA, S.H.A.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Mol Plant Microbe Interact** 13: 995–1009, 2000.

O'FAREL, P. H. Hight-resolutions two dimensional eletrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

PANTER, S.; THOMSON, R.; BRUXELLES, G.; LAVER, D.; TREVASKIS, B.; NOVARD, M. Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. **Molecular Plant Microbe interactions**, v.13, p. 325-333, 2000.

PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia** vol.1. São Paulo, Agronômica Ceres, p.444-445, 1995.

PAULITZ, T. C. & LINDERMAN, R. G. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: Arora, D. K. et al., (EDS). Handbook of Applied Mycology. Marcel Deker, Inc., **New York**. P. 77-129, 1991.

PEREIRA,F.; LOVATO,P.E. Seleção de substratos e fungos micorrízicos arbusculares para aclimatização de porta-enxertos de videira. Relatório ao Programa Pibic/CNPq 2002.

PETGEN, M.; SCHROPP, A.; GEORGE, E.; ROMHELD, V. Influence of different inoculum places of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on mycorrhizal colonization in grapevine rootstocks (*Vitis* sp.). **Vitis** 37: 99, 1998.

ROCHA, T. L. ; COSTA, P. H. A. ; MAGALHAES, J. C. C. ; Evaristo, R. G. S ; VASCONCELOS, E. A. R. ; COUTINHO, M. V. ; PAES, N. S. ; SILVA, M. C. M. ; SA, M. F. G. . Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. **Comunicado Técnico da Embrapa**, v. 136, 2005.

ROMERO , A.G. Avaliação agrônômica de formulações de isoflavonóides estimulantes da micorrização no milho (*Zea mays* L.) Lavras, 1999. 40p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Lavras.

ROSIER, J.C. & LOSSO, M.A. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Viticultura. **EPAGRI, Boletim Técnico nº 83**, Florianópolis, 41p, 1997.

SAGGIN JÚNIOR, O.J. & LOVATO, P.E. Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O.,MOREIRA, F.M.S., LOPES, A.S. GUILHERME, L.R.L.,FAQUIM, V. Inter-relação fertilidade, Biologia do Solo e nutrição de Plantas, SBSC UFLA/ DCS. Viçosa:, 1999.

SALZER P, BOLLER T. Elicitor-induced reactions in mycorrhizae and their suppression. In: Podila GK, Douds DD, eds. Current advances in mycorrhizae

research. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, 1–10, 2000.

SALZER, P.; CORBIÉRE, H.; BOLLER, T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. **Planta** 208:319-325, 1999.

SAMRA A.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI. S. Detection of symbiosis-related polypeptides during the early stages of the establishment of arbuscular mycorrhiza between *Glomus mosseae* and *Pisum sativum* roots. **New Phytol** 135:711–722, 1997

SANTOS, B. A.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus level on expression of protein and activity of peroxidase on passion fruit roots. **Brazilian Journal Biology**, v.61 n.4, 2001.

SCHENCK, N. C.; KELLAM, M. K. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on disease development. Florida **Agric. Exp. Sta., Gainesville**, 16 p. (Tech. b. 798), 1978.

SCHUCK, E.; DAL BÓ, M.A.; ANDRADE, E.R. Avaliação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 2001/2002. **EPAGRI**. Boletim Técnico nº 117. Florianópolis, 147-149p, 2001.

SCHÜSSLER A, SCHWARZOTT D, WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**.105: 1413–1421. 2001.

SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Germany: **Technal Cooperation**,371p. , 1991.

SILVA JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Colonização micorrízica e crescimento da soja com diferentes fungos e aplicação do isoflavonóide formononetina. **Pesquisa agropecuária brasileira-PAB**, vol 33, nº 6, 1998.

SILVA, J.C. Efeitos de isolados de *F.oxysporum* não patogênicos na redução da severidade de murcha de fusarium em tomateiro. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP. Área de concentração em Proteção de Plantas.

SILVA. R.P.; SOUZA, P.V.D.; AMARAL, A.L. Influencia de fungos micorrízicos arbusculares na aclimatização do porta-enxerto de videira 101-14 micropropagado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA**, 9.,1999, Bento Golçalves. Anais: EMBRAPA-CNPUV, 1997.p137.
SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. Seção de Microbiologia do Solo, Instituto Agrônômico de Campinas. CARDOSO, E.J.B.N. (COORD). **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.263, 1992.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. Seção de Microbiologia do Solo, Instituto Agrônômico de Campinas. CARDOSO, E.J.B.N. (COORD). **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.263, 1992.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; SÜMER, S.I. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.25, p.12-21, 2002.

SMITH, S. E., St. JOHN, J., SMITH, F. A. & NICHOLAS, D. J. D., 1985, Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol.*, 99: 211-227.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. 2.ed. San Diego, California: **Academic**, 605p 1997.

SOMSSICH, I., K. HAHLBROCK. Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. **Trends Plant Sci.**, 3, 86–90,1998.

SONEGO, O.R. Avaliação de Porta-enxertos de videira frente a fusariose, em condições de campo. **EMBRAPA**. Comunicado Técnico. nº 28, Bento Gonçalves 4p, 1998.

SOUSA, S.I.J. Uvas para o Brasil., Piracicaba : **FEALQ**, 791p, 1996.

SOUZA, P.V.D.; MORALES, C.F.G.; KOLLER, O.C. Influencia de substratos e fungos micorrízicos no enraizamento de estacas de laranjeira (*Citrus sinensis* Osb.cv. Valência). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.1, n.1, p 37-40, 1995.

SOUZA, S.L. Análise do proteoma do fluído intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2002. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em solos e nutrição de plantas.

STEINER,N. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante a embriogênese zigótica e somática de *Auracaria angustifolia* (BERT.) O. KUNTZE. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

STEINMACHER, D.A. Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. **Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 2005. 1 v. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

STOYANOVA, S.D. Variation of gliadins in wheat cultivars associated with seed survival and multiplication. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.24, n.2, p.115-126, 1996.

TOMAZI, A.; COSTA, M. D.; LOVATO, P. E.; DALSOGLIO, F. K. Fungos e bactérias com efeito antagônico in vitro a *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. e *Fusarium oxysporum* Schf. sp. *herbemontis* In. VII REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1998, Caxambu FertBIO 98, Resumos, Caxambu, MG **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 115-115, 1998.

TREVORS, J.T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. **Journal of Microbiological Methods**, 26:53-59, 1996.

TRINDADE, A.V.; SIQUEIRA, J.O. & ALMEIDA, F.P. Eficiência simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares em solo não fumigado para mamoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 24:505-513, 2000

TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L. et V. GIANINAZZI-PEARSON. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: **Mycorrhizes: physiologie et génétique**. 1st ESM/ 1^{er} SEM, Dijon, 1-5 July 1985 - INRA, PARIS, 1986, p. 217-220.

TSAI, S.N.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores "in vitro:". **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p. 1485-1488, 1991.

VESTBERG, M, Arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry and field observations in Finland, **Agronomie** 12: 865-867, 1992.

VOLPIN, D. A.; PHILLIPS, Y.O.; KAPULNIK, Y. Suppression of an Isoflavonoid Phytoalexin Defense Response in Mycorrhizal Alfalfa Roots. **Plant Physiol.** 108: 1449-1454. 1995.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D>A.; OKON, Y.; KAPULNICK, V. Supression on an Isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfafa roots. **Plant Physiology**, v.108. p.2598-2602, 1995.

WALKER, J.M. The Bradford Method for Protein Quantitationm. In: Walker, J.M. (Ed). The protocols handbook 2ed. Totowa: **Humana Press** Inc., 2002. p15-21.

WERTH, C. R. Implementing an isozyme laboratory at a field station. **Virginia Journal of Science** 36: 53–76, 1985.

WYSS, P.; MELLOR, R.B.; WIEMKEN, A. Mutants of soybean (*Glicine max*) unable to suppres nodulation in the presence of nitrate retain the ability to suppres mycorrhization in the presence phosfate. **Journal Plant Physiology**. V.136, p 507-509, 1990.

8. ANEXOS